

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LE BCG EST-IL VIRULENT POUR LE HAMSTER DORÉ
DE SYRIE ?

par F. van DEINSE et FRANÇOISE SÉNÉCHAL (*).

(Institut Pasteur. Laboratoires du BCG.)

Quelques rares auteurs ont essayé de se servir du hamster doré de Syrie (*Mesocricetus auratus*) pour le diagnostic expérimental de la tuberculose.

J. Ungar, le premier, en 1942, a inoculé des bacilles tuberculeux virulents de type humain ou bovin, par voie intramusculaire ou intrapéritonéale, chez des hamsters, et a vu se développer, chez ces animaux, des lésions anatomiques ressemblant à celles qu'on trouve chez le cobaye tuberculisé. Même des doses réduites, de l'ordre de 0,001 mg de bacilles virulents de type humain ont donné, entre les mains de Ungar, chez le hamster après seize à vingt jours, des hypertrophies des ganglions lymphatiques régionaux, mésentériques et trachéo-bronchiques et des granulations visibles à l'œil nu sur la rate, le foie et les poumons [1].

En 1947, M. Giroux a publié une opinion moins optimiste que Ungar, au sujet de l'utilité du hamster pour l'expérimentation sur la tuberculose. Il a constaté que l'inoculation de B. K. humains par voie sous-cutanée chez cet animal, à la dose de 0,1 ou 0,5 mg, provoque des lésions tuberculeuses discrètes, évoluant très lentement, et ne se caséifiant jamais. Quand on inocule au hamster une dose de 0,5 mg de B. K. bovins, par voie sous-cutanée, l'animal est tuberculisé plus rapidement, et on trouve surtout

(*) Manuscrit reçu le 17 juin 1954.

des lésions plus étendues aux poumons qu'ailleurs. Il semble, d'après ces expériences, que le hamster soit plus sensible aux B. K. bovins qu'aux B. K. humains [2].

H. J. Corper et M. J. Cohn, qui ont étudié l'évolution de la tuberculose expérimentale simultanément chez le cobaye et chez le hamster, accordent leur préférence au cobaye, tout en signalant, eux aussi, la plus grande réceptivité du hamster pour le bacille bovin que pour le bacille humain [3].

P. Hauduroy et W. Rosset ont inoculé, par voie sous-cutanée, à des hamsters et des cobayes, des bacilles tuberculeux de types différents à des doses variables. D'après ces auteurs, le cobaye est plus sensible à l'infection tuberculeuse expérimentale que le hamster. Ces auteurs n'ont pratiquement pas trouvé, chez le hamster, de différence de sensibilité aux bacilles tuberculeux humains et bovins. Il ne leur paraît pas possible, par conséquent, d'utiliser le hamster pour le diagnostic différentiel des variétés du bacille tuberculeux humain et bovin [4].

L. Hussel a inoculé 16 hamsters dorés et 16 cobayes par voie sous-cutanée, intrapéritonéale ou intrapulmonaire avec 50 000 à 2 000 000 de bacilles tuberculeux de type bovin virulents. L'intradermo-réaction à la tuberculine devint positive chez les cobayes onze jours après l'inoculation, et vingt-quatre jours après celle-ci chez les hamsters. Les animaux furent sacrifiés trente à quarante jours après l'inoculation virulente : deux hamsters seulement présentaient à l'autopsie des lésions tuberculeuses macroscopiques, alors que tous les cobayes avaient déjà des lésions spécifiques. Ces résultats, ainsi que d'autres inconvénients du hamster montrent, d'après Hussel, que la valeur de cet animal pour le diagnostic de la tuberculose ne peut être comparée à celle du cobaye [5].

U. Reuss a inoculé des produits pathologiques suspects de tuberculose simultanément à des cobayes et des hamsters dorés de Syrie. Sur 253 produits inoculés, la présence de B. K. fut mise en évidence 49 fois (15,4 p. 100) par l'inoculation au cobaye et 22 fois (8,7 p. 100) par l'inoculation au hamster. Reuss en conclut que pour le diagnostic de la tuberculose l'inoculation au cobaye est préférable à l'inoculation au hamster [6].

A. Imamura et Y. Kawamori ont inoculé à des hamsters dorés 1 ou 0,1 mg de B. K. humains virulents ; sacrifiés six semaines plus tard, les animaux présentaient de rares lésions macroscopiques, mais l'ensemencement des organes donna des cultures positives. Ces auteurs ont, d'autre part, inoculé des hamsters dorés avec 60 mg de BCG par voie sous-cutanée. Ils les ont sacrifiés six semaines plus tard et n'ont trouvé à l'autopsie aucune lésion spécifique ni dans les organes, ni dans les ganglions lymphatiques. Les ensemencements des organes de ces animaux ont cependant donné de nombreuses colonies de BCG [7].

T. Murohashi et K. Yaganisawa ont inoculé 5 hamsters dorés avec 10 mg de BCG par voie sous-cutanée et 5 autres avec 5 mg de BCG par voie intratesticulaire. Les animaux furent sacrifiés respectivement après

six et douze semaines. Ils réagissaient alors négativement à la tuberculine. Aucune lésion n'était visible à l'autopsie. L'examen histologique révéla de petits foyers de cellules épithélioïdes contenant des bacilles acido-résistants sans aucune tendance à la nécrose. Les ensements ont donné des cultures de BCG pour les deux groupes de hamsters [8].

J. Oka a inoculé des hamsters avec 10 mg de BCG par voie intramusculaire. Les animaux étaient tous encore en vie six mois plus tard et furent alors sacrifiés. Oka trouva chez tous ces hamsters un abcès froid au point d'inoculation et quelques granulations sur la rate et les ganglions lymphatiques. L'examen microscopique révéla la présence de bacilles acido-résistants dans les organes et des amas de cellules épithélioïdes sans aucune tendance à la nécrose [9].

Il semble que le hamster chinois (*Cricetulus griseus*) soit plus sensible que le hamster doré syrien à l'inoculation des B. K. F. L. Wang et C. H. Meng ont étudié cet animal sous ce rapport, et ont comparé les résultats, obtenus par l'inoculation de différents produits pathologiques au hamster chinois, avec ceux de l'ensemencement de ces mêmes produits : ils ont obtenu 69 p. 100 de résultats positifs après inoculation et 57 p. 100 après ensemencement. Ces auteurs en concluent que le hamster chinois est aussi sensible à l'inoculation tuberculeuse que le cobaye [10].

Wang a constaté, en outre, que le hamster chinois est, comme le hamster de Syrie, plus sensible au bacille bovin qu'au bacille humain. L'inoculation intratesticulaire ou intrapéritonéale produit, chez cet animal, des lésions plus précoces et plus étendues que l'inoculation sous-cutanée [11].

Cependant, quel que puisse être l'intérêt du hamster chinois, les publications qui ont trait au hamster doré de Syrie, que nous venons de résumer, donnent l'impression que cet animal ne présente, pour la tuberculose expérimentale, qu'un intérêt relatif, et que le hamster doré semble répondre moins régulièrement et avec moins de lésions spécifiques à une inoculation tuberculeuse virulente que le cobaye. On voit en outre que des inoculations de fortes doses de BCG ne déclenchent pas, chez ce hamster, de réactions différentes de celles que provoque le BCG chez le cobaye.

Il peut donc paraître d'autant plus étonnant que P. Hauduroy et ses collaborateurs aient constaté que le BCG se montre pathogène pour le hamster doré de Syrie, alors que l'absence de pouvoir pathogène pour le cobaye de ce même BCG est aujourd'hui universellement reconnue.

Dans une note à l'Académie des Sciences, P. Hauduroy et W. Rosset ont, en effet, publié leurs premières expériences d'inoculation de BCG au hamster doré de Syrie [12]. Cette note fut bientôt suivie d'un article dans *La Presse Médicale* sur le même

sujet [43]. Enfin, dans cette même Revue, J.-L. Nicod, P. Haudroy et W. Rosset décrivent les lésions anatomo-pathologiques que provoque, chez le hamster, l'inoculation de BCG [44].

Il s'agit de hamsters qui furent inoculés soit par voie sous-cutanée, soit dans le péritoine, avec des doses de BCG prises dans des ampoules de vaccin frais destinées à la vaccination par scarifications cutanées, et représentant la valeur de 1/2 ampoule (37,5 mg), de 1 ampoule (75 mg), de 2 ampoules (150 mg) ou de 3 ampoules (225 mg). D'autres hamsters reçurent, par les mêmes voies, des organes de hamsters inoculés avec du BCG. Si l'on considère qu'en matière de virulence, le B. K. manifeste son activité à des doses infimes, puisque un dix millième de mg et même moins, suffit à tuberculiser le cobaye, on peut être surpris que ces expérimentateurs aient choisi, pour la démonstration de la virulence du BCG, des doses révélatrices variant de 37,5 mg à 225 mg, c'est-à-dire de 370 000 à 2 250 000 fois plus grandes que les doses normales d'expérimentation.

Sur 64 hamsters ainsi inoculés, 29 étaient morts au moment de la parution de la note à l'Académie des Sciences, dont 2 avaient succombé prématurément à une maladie intercurrente. La mort des 27 hamsters restants s'est produite en huit à douze mois environ pour les inoculations sous-cutanées, et en un à quatre mois pour les injections intrapéritonéales. A l'autopsie, les lésions, *quand elles sont visibles à l'œil nu*, ne sont pas localisées au point d'inoculation.

Il s'agit, à l'examen microscopique, de lésions inflammatoires folliculaires à polynucléaires d'abord, macrophagiques ensuite ; plus tard apparaissent des cellules épithélioïdes et des cellules géantes du type Langhans. Souvent les foyers restent morphologiquement aspécifiques, en ce sens qu'ils n'ont pas de centre nécrotique et que leurs éléments n'ont pas la disposition topographique classique du follicule tuberculeux. Enfin la fibrose s'installe autour du foyer inflammatoire et l'encapsule ou même le cicatrice. Chez les hamsters inoculés avec de fortes doses de BCG dans le péritoine, on trouve des nappes nécrotiques contenant de véritables abcès fourmillant de bacilles. A la périphérie de ces nappes la barrière épithélioïde semble se constituer rapidement, ébauche d'une cicatrisation future. La rate peut être noyée dans ces masses nécrotiques et il existe de nombreuses adhérences dans le péritoine.

Toutes ces lésions se retrouvent chez le hamster inoculé avec des bacilles tuberculeux virulents, avec, en plus, la caséification typique des follicules.

Enfin, chez quelques animaux inoculés avec du BCG, les reins, le foie et la rate contenaient des dépôts d'amyloïde, et dans le rein existait une néphrose avec *dégénérescence granu-*

leuse et graisseuse des tubes contournés et présence de cylindres albumineux et hyalins dans les tubes sécrétateurs et excréteurs.

Les publications de Hauduroy et de ses collaborateurs ont suscité, de la part des auteurs autrichiens K. Berger et F. Puntigam, une série d'expériences, dont ils ont publié les résultats en 1953 [15].

Berger et Puntigam se sont servis, pour leurs expériences, de trois cultures de BCG, dont deux provenaient de Paris, et une de Suède. Ils ont inoculé des doses variant de 75 à 225 mg de BCG par voie péritoneale chez 26 hamsters, et par voie sous-cutanée chez 29 hamsters. Les résultats de ces inoculations sont décrits avec tous les détails, et Berger et Puntigam en tirent les conclusions suivantes : le BCG ne provoque pas, chez le hamster, d'autres lésions que chez le cobaye ou le lapin. Ces lésions ne sont aucunement comparables à celles causées par un bacille tuberculeux virulent. La mort du hamster inoculé avec de fortes doses de BCG n'est pas une mort par tuberculose dans le sens courant de ce mot. Les lésions causées par le BCG chez le hamster ont une tendance nette à la régression et à la guérison. Elles ne sont pas progressives ; elles sont même absentes chez de nombreux hamsters inoculés par voie sous-cutanée. La seule chose qui frappe, c'est la perte de poids considérable que subissent les hamsters à la suite d'inoculations massives de BCG. Il semble ne pas s'agir des effets d'une « virulence » du BCG, d'activité pathogène à proprement parler, mais bien plutôt d'une sorte d'intoxication par les substances endo-bacillaires du BCG. En effet, dans une série d'expériences de contrôle, les auteurs ont inoculé à des hamsters de 50 à 20 mg de BCG tué par chauffage, ou bien de la tuberculine BCG ou même de la tuberculine ordinaire, et ils ont vu que la plupart de ces animaux sont morts en quelques mois dans un état de cachexie profonde. Un certain nombre de hamsters inoculés avec du BCG mort avaient dans le foie les mêmes lésions histologiques qu'on trouve chez les hamsters inoculés avec du BCG vivant, et ces lésions contenaient également des bacilles acidorésistants. Berger et Puntigam concluent de leurs expériences, que la « virulence » du BCG pour le hamster n'est autre qu'une hypersensibilité de cet animal vis-à-vis des substances endo-bacillaires du BCG ou des produits du métabolisme de ce germe.

Nous avions entrepris nous-mêmes, dès 1951, la vérification des expériences de Hauduroy et de ses collaborateurs sur le hamster doré de Syrie (*Mesocricetus auratus*). Pour des raisons en dehors de notre volonté, ces expériences ont dû être interrompues et ce n'est qu'aujourd'hui que nous sommes à même d'en publier les résultats et l'interprétation.

1^o *Dans une première série d'expériences nous avons inoculé 5 hamsters dorés par voie intrapéritonéale avec 50 mg de BCG vivant, dont 3 avec la culture couramment employée à l'Institut Pasteur pour la préparation du vaccin, un avec une culture BCG constamment tenue sur pomme de terre biliée, et un avec la souche BCG suédoise.*

Deux des hamsters inoculés avec le BCG normal français sont morts en un et deux mois respectivement : le premier présentait à l'autopsie une rate moyennement hypertrophiée portant quelques granulations, et un épiploon épaissi. Pas d'autres lésions visibles. Le deuxième avait la rate tuméfiée comme le précédent, rien par ailleurs. Le troisième animal de ce groupe fut sacrifié en bonne santé, six mois après l'inoculation, et ne présentait pas la moindre lésion à l'autopsie.

Le hamster inoculé avec 50 mg dans le péritoine avec la culture BCG biliée est mort dix jours après sans avoir à l'autopsie aucune lésion visible.

L'animal qui avait reçu dans le péritoine 50 mg de la culture BCG suédoise est mort douze jours plus tard, et n'avait, lui non plus, aucune lésion visible.

2^e Dans une deuxième série nous avons ensuite inoculé 16 hamsters, chacun avec 40 mg de BCG français courant dans le péritoine. Cinq de ces animaux sont morts prématurément dans les six premiers jours qui ont suivi l'inoculation.

Trois hamsters de cette série sont morts un mois après l'inoculation : l'un d'eux avait un abcès froid au point d'injection sans autres lésions visibles, les deux autres étaient indemnes, macroscopiquement, de toute lésion suspecte.

Un animal est mort après deux mois : nous n'avons trouvé à l'autopsie, aucune lésion visible ; sur les frottis de la rate on voyait de très nombreux bacilles acido-résistants, et le foie et les poumons en contenaient d'assez nombreux. Les ensemencements de ces organes ont donné des cultures typiques de BCG.

Un hamster est mort après trois mois d'une pneumonie intercurrente. Il ne présentait à l'autopsie aucune lésion spécifique ; les ensemencements des organes ont donné des cultures de BCG.

Un hamster est mort lui aussi en trois mois, mais nous avons trouvé le cadavre en partie dévoré et l'autopsie était, de ce fait, impossible.

Un animal est mort en trois mois et trois semaines : à part une rate moyennement hypertrophiée, nous n'avons, à l'autopsie, trouvé rien de suspect. Voici le résultat de l'examen histologique du foie, de la rate et du poumon de cet animal : foie : micro-nodules nécrotiques, congestion des vaisseaux avec fibrose interstitielle. De très nombreux bacilles acido-résistants. Poumon : infiltration généralisée avec micro-nodules nécrotiques : desquamation de la muqueuse bronchique. Bacilles a.-r. nombreux. Rate : aplasie cellulaire ; architecture à peine reconnaissable. Bacilles a.-r. nombreux.

Un hamster de cette même série est mort après quatre mois d'une péritonite à anaérobies (son épiploon était normal).

Un hamster est mort après six mois et demi. Nous avons trouvé la rate légèrement hypertrophiée, rien par ailleurs (l'épiploon était d'aspect normal). Sur les frottis du foie et de la rate on voyait de très nombreux bacilles a.-r.

Enfin deux hamsters ont survécu et nous les avons sacrifiés un an et trois mois après l'inoculation : les deux animaux étaient en excellente santé et avaient augmenté d'au moins 50 g en poids. A l'autopsie, nous avons trouvé : chez l'un, 6 granulations grises sur le poumon gauche, rien par ailleurs ; chez l'autre, une hypertrophie importante

de la rate (dix fois le volume normal) sans autres lésions. L'examen histologique a donné, chez ces deux hamsters, les résultats suivants : chez le premier, rien à signaler dans le foie, sauf une légère congestion ; la rate était hémorragique et contenait de nombreuses cellules réticulées (pas de bacilles a.-r.) ; dans le poumon, réticulose diffuse des parois alvéolaires et petits nodules d'alvéolite macrophagique sous-pleuraux, entourés d'une zone congestive et contenant des bacilles a.-r. Chez le deuxième hamster, sacrifié après un an et trois mois, les coupes du foie montrent de nombreux micro-nodules monocytaires disséminés, juxta-vasculaires ou en plein parenchyme avec une prolifération des cellules de Kupffer dans les sinus et autour des vaisseaux ; on voit des bacilles a.-r. La rate, énorme, montre une fibrose hyaline et des cordons de cellules réticulées macrophagiennes d'aspect pseudo-tumoral ; il y a de nombreux bacilles a.-r. Les coupes de poumon montrent les mêmes images que chez le premier de ces deux hamsters.

3^e Dans une troisième série, nous avons inoculé 8 hamsters, chacun avec 100 mg de BCG français ordinaire par voie péritonéale.

Deux animaux sont morts huit jours plus tard, ayant des nodules nécrotiques sur le foie et l'épiploon ; les frottis du foie et de la rate fourmillaient de bacilles a.-r.

Un troisième est mort deux mois après l'inoculation : il y avait chez lui des adhérences hépatiques et l'épiploon était épaisse mais non caséuse ; nous avons trouvé de très nombreux bacilles a.-r. dans la rate, nombreux dans le foie, mais aucun dans le poumon.

Le quatrième hamster est mort, lui aussi, après deux mois : il y avait chez cet animal des adhérences péritonéales, mais l'épiploon était normal ; la rate était légèrement hypertrophiée ; les bacilles a.-r. étaient très nombreux dans la rate, nombreux dans le foie, peu nombreux dans le poumon.

Deux animaux de cette série sont morts deux mois et demi après l'inoculation de BCG, l'un d'une infection intercurrente. Chez l'autre, l'autopsie était impossible à cause d'une putréfaction cadavérique avancée.

Le septième hamster est mort après trois mois et demi : à part des adhérences intestinales, il n'y avait aucune lésion visible à l'autopsie. Les frottis de la rate fourmillaient de bacilles a.-r. et le foie en contenait également de nombreux. L'examen histologique a donné les résultats suivants : foie : architecture bouleversée, congestion très importante avec exsudat abondant ayant dissocié les travées hépatiques ; réaction lympho-histiocytaire généralisée ; nombreux bacilles a.-r. Rate : magma de cellules lymphocytaires et de noyaux pycnotiques au sein d'un exsudat important, rendant le diagnostic d'organe presque impossible ; bacilles a.-r. nombreux. Poumon : congestion et tramite totale ; nombreux bacilles a.-r.

Les organes de ce septième hamster furent broyés au mortier et inoculés à 4 hamsters neufs (*voir plus loin*).

Enfin le huitième hamster de la série est mort après sept mois et demi. A l'autopsie nous trouvâmes une rate énorme (quinze fois le volume normal) portant des nodules caséux, et le poumon gauche parsemé de fines taches grises ; rien par ailleurs. De très nombreux bacilles a.-r. dans la rate, assez nombreux dans le foie et le poumon.

L'examen histologique a donné les résultats suivants : poumon : splénomégalie diffuse à type d'alvéolite œdématoise, sérofibrineuse et macrophagique ; congestion diffuse des parois alvéolaires. Pleurésie fibrineuse ; rares bacilles a.-r. dans le poumon, nombreux dans la zone pleurale fibrineuse. Foie : congestion, infiltrats des espaces porte, dégénérescence du parenchyme. Rate : inflammation nodulaire diffuse.

Les 4 hamsters neufs, inoculés par voie sous-cutanée avec les organes broyés du hamster n° 7 sont morts respectivement après trois mois, quatre mois et demi, six mois et sept mois et demi. Chez aucun d'eux l'autopsie n'a révélé la moindre lésion spécifique macroscopique ; chez deux d'entre eux nous avons trouvé des bacilles a.-r. peu nombreux dans la rate.

4^e Enfin, dans une quatrième série, 10 hamsters reçurent, toujours par voie péritonéale, 0,1 mg de BCG vivant ordinaire.

Le premier est mort après vingt-sept jours : nous n'avons rien trouvé d'anormal à l'autopsie, et seule la rate semblait contenir de très rares bacilles a.-r.

Un deuxième hamster de cette série est mort après trois mois et demi d'une infection intercurrente ; à l'autopsie nous n'avons trouvé que quelques adhérences péritonéales ; rien par ailleurs.

Le troisième animal est mort après cinq mois : à l'autopsie rien à signaler ; de très rares bacilles dans la rate.

Le quatrième hamster est mort après cinq mois et demi : à part une rate légèrement tuméfiée, rien à signaler. La rate contient quelques rares bacilles a.-r.

Le cinquième meurt une semaine après le précédent : rien à signaler à l'autopsie, sauf une rate légèrement hypertrophiée.

Les sixième et septième hamster sont morts après six mois d'une pneumonie intercurrente ; dans la rate de ces deux animaux nous avons trouvé de nombreux bacilles a.-r.

Nous avons sacrifié les 3 hamsters restants six mois après l'inoculation. Chez tous les trois, l'autopsie n'a révélé rien d'anormal à l'examen macroscopique. L'examen histologique a révélé chez ces animaux les faits suivants : dans le foie il y a de rares micro-nodules épithélioïdes et lymphocytaires, parfois juxta-vasculaires, la plupart en plein parenchyme, accompagnés d'une réticulose discrète des sinusoides. Dans la rate on voit, ou bien de très nombreux nodules épithélioïdes disséminés dans toute la pulpe, ou bien des hémorragies et nécroses à la périphérie et au centre des plages de cellules épithélioïdes avec effacement des follicules de Malpighi ; rares bacilles a.-r.

En parcourant ces protocoles, on est frappé par trois choses :

1^o La mort d'un grand nombre de hamsters dans les mois qui suivent l'inoculation intrapéritonéale de BCG.

2^o L'absence de lésions caractéristiques, spécifiques, macroscopiques chez la plupart des animaux, à part la réaction typique du péritoine, notamment de l'épiploon dans les premiers temps qui suivent l'inoculation intrapéritonéale de fortes doses de BCG, réaction naturelle à toute introduction dans le péritoine d'une

substance étrangère, et l'hypertrophie de la rate chez de nombreux animaux.

3° Les images histologiques qu'on trouve souvent en l'absence de toute lésion macroscopique, dans la rate, le foie et le poumon, qui s'apparentent à celles que nous avons si souvent trouvées chez des lapins inoculés avec des bacilles tuberculeux morts [16].

Le fait de trouver de très grandes quantités de bacilles a. r. notamment dans la rate chez des animaux auxquels on a injecté des masses impénitentes de BCG, n'a rien de surprenant ; chez les hamsters inoculés dans le péritoine avec 0,1 mg de BCG on retrouve ces bacilles avec peine.

Nous avons donc voulu vérifier l'effet qu'aurait chez le hamster l'*inoculation de BCG mort*.

A cette intention, nous avons préparé une suspension de BCG dosée à 40 mg par centimètre cube, et nous avons chauffé cette suspension pendant deux heures au bain-marie à 100°. Des ensements de contrôle nous ont montré que les germes étaient bien morts. De cette suspension nous avons injecté 1 cm³ par voie péritonéale chez 9 hamsters, chacun recevant par conséquent 40 mg de BCG tué.

Un premier hamster est mort après trois mois et trois semaines : aucune lésion ne fut trouvée à l'autopsie, les ensements sont restés stériles.

Les deux suivants sont morts après cinq mois et trois semaines : les deux avaient des adhérences péritonéales, et l'un une congestion des poumons. Nous avons trouvé de rares bacilles a.-r. dans la rate et le foie.

Le quatrième hamster est mort après six mois d'une infection intercurrente.

Le cinquième est mort après six mois et demi d'une pneumonie intercurrente : il avait des adhérences péritonéales et un ganglion sous-lombaire caséux.

Un sixième animal est mort, lui aussi, d'une pneumonie après six mois et trois semaines : il y avait des adhérences.

Le septième hamster est mort après sept mois : à l'autopsie, à part une congestion des poumons, rien à signaler.

Le huitième et le neuvième hamster ont été sacrifiés sept mois et huit jours après l'inoculation du BCG tué : à part des adhérences, rien à signaler à l'autopsie ; chez les deux, il y eut d'assez nombreux bacilles a.-r. dans la rate. L'examen histologique a révélé chez ces deux hamsters les faits suivants : dans le foie on voyait une réticulose micronodulaire discrète des espaces porte en amas d'histiocytes, de polyclastes et de rares éosinophiles sans atteinte des cellules hépatiques. Rate : congestion intense et œdème de toute la pulpe rouge avec réticulose, présence de collagène et dépôts hématiques ; les follicules de Malpighi sont très réduits et contiennent cependant de nombreux réticulocytes. Fibrose capsulaire importante avec amas de réticulocytes

d'aspect épithélioïde sous-péritonéaux dans lesquels on constate de rares bacilles a.-r.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons injecté 100 mg de BCG tué par chauffage par voie péritonéale à chacun de 9 hamsters.

Un premier hamster est mort quinze jours après l'inoculation : nous avons trouvé à l'autopsie quelques adhérences péritonéales ; les organes semblaient normaux ; l'examen microscopique des frottis du foie et de la rate montrait que ces organes fourmillaient de bacilles acidorésistants. Les ensemencements sont restés négatifs.

Un deuxième hamster est mort après un mois et demi : l'autopsie était impossible, le cadavre ayant été en partie dévoré.

Nous avons alors sacrifié 2 hamsters un mois et demi après l'inoculation : les deux avaient des adhérences viscérales, et l'un avait une hypertrophie moyenne de la rate. De nombreux bacilles furent trouvés dans la rate hypertrophiée, et la rate (de taille normale) de l'autre animal fourmillaient de bacilles a.-r. Les ensemencements sont restés négatifs.

Un hamster de cette série est mort après deux mois et demi : à part des adhérences viscérales, rien à signaler macroscopiquement. A l'examen microscopique nous avons vu que le foie fourmillaient de bacilles a.-r. L'examen histologique a révélé les faits suivants : foie : nodules lymphocytaires autour des espaces porte biliaires enserrant les canaux biliaires atrésiques. Poumon : tramite généralisée avec alvéolite œdémateuse consécutive à une congestion intense ; nodules intramusculaires siégeant au contact de la plèvre ayant dissocié les cloisons intermusculaires : de très nombreux bacilles a.-r. Rate : aplasie cellulaire ; architecture à peine reconnaissable.

Les 4 hamsters survivants furent sacrifiés trois mois et demi après l'inoculation. L'un d'eux était atteint d'une infection intercurrente. Les trois autres avaient tous des adhérences péritonéales. Chez l'un d'eux la rate contenait de très nombreux bacilles a.-r., présents à l'état d'unités dans la rate et le foie chez les deux autres. L'examen histologique des organes de deux d'entre ces animaux a donné les résultats suivants : Rate : exsudat et réticulose généralisée, nodules histiocytaires nombreux, sclérose de l'organe. Foie : cellules vasculaires et petits infiltrats périporto-biliaires à lymphocytes ; bacilles a.-r. nombreux. Poumon : infiltrats et tramite.

A l'exemple de Berger et Puntigam, nous avons voulu compléter cette étude par des injections de tuberculine. Nous avons donc injecté chez chacun de 5 hamsters, par voie péritonéale, 375 U. I. de tuberculine purifiée I. P. 48.

Un seul hamster a survécu à cette injection ; les quatre autres sont morts en dix-sept, vingt-cinq, quarante et un et cinquante et un jours respectivement. A l'autopsie nous n'avons trouvé aucune lésion macroscopique chez ces animaux. Voici ce qu'a révélé l'examen histologique :

1^o Hamster mort après vingt-cinq jours : foie : congestion diffuse avec dilatation des sinusoides et prolifération des cellules de Kupffer. Dégénérescence vacuolaire de nombreuses cellules hépatiques. Rate : inflammation macrophagique et nécrotique par endroits.

2^o Hamster mort après cinquante et un jours. Foie : dilatation extrême des vaisseaux sus-hépatiques et des espaces porte avec nécrose des endothéliums, hyalinisation des tuniques, fibrine et infiltration histiocytaire. Sinusoïdes non congestionnés. Réticulose et multiplication des cellules de Kupffer. Atrophie et nécrose parcellaire des cellules hépatiques qui sont peu altérées par rapport aux vaisseaux. Rate : follicules rares et atrophiques ; la pulpe rouge, pauvre en cellules, est homogène et comporte également de la substance hyaline entre des cellules réticulées.

DISCUSSION.

Il ressort en premier lieu de nos expériences, que de nombreux hamsters meurent au cours des mois qui suivent l'inoculation intrapéritonéale de BCG vivant.

En effet, sur 5 hamsters inoculés avec 50 mg, 2 sont morts au cours du premier mois, 1 après un mois et 1 après deux mois. Un seul a survécu et a été sacrifié six mois après l'inoculation.

Sur les 16 hamsters inoculés dans le péritoine avec 40 mg de BCG vivant, 5 sont morts au cours du premier mois, 4 après un mois, 1 après deux mois, 2 après trois mois, 2 après quatre mois et 1 au cours du septième mois ; 2 seulement ont survécu à l'inoculation et furent sacrifiés un an et trois mois après.

Sur les 8 hamsters inoculés par la même voie avec 100 mg de BCG, 2 sont morts au cours du premier mois, 2 après deux mois, 2 au cours du troisième mois, 1 au cours du quatrième mois, et 1 au cours du huitième mois.

Les 4 hamsters de passage, inoculés avec le broyat d'organes de l'avant-dernier animal, sont morts en trois, quatre et demi, six et sept mois et demi respectivement. Ceci n'a rien d'étonnant quand on considère le nombre considérable de bacilles BCG que contenaient les organes du cobaye n° 7 de cette série.

Sur les 10 hamsters inoculés avec 0,1 mg dans le péritoine, 1 est mort au cours du premier mois, 1 au cours du quatrième mois, 1 après cinq mois, 1 au cours du sixième mois, 2 après six mois, et 3 ont été sacrifiés après six mois de survie.

Voyons maintenant ce qui se passe quand on injecte à des hamsters du BCG tué par chauffage au lieu de BCG vivant.

Sur les 9 hamsters inoculés dans le péritoine avec 40 mg de BCG tué, aucun n'est mort au cours du premier mois. Leur mort s'échelonne sur les quatre à sept mois suivant l'inoculation ; 2 ont survécu plus de sept mois et furent sacrifiés.

Sur 9 hamsters inoculés avec 100 mg de BCG tué, 1 seul est mort au cours du premier mois, 2 sont morts au cours des deuxième et troisième mois ; les autres furent sacrifiés respecti-

vement un mois et demi et trois mois et demi après l'inoculation.

Enfin sur les 5 hamsters inoculés avec une forte dose de tuberculine purifiée, 1 seul a survécu, les autres sont morts au cours du premier et deuxième mois.

Une chose semble ressortir de ces expériences : le hamster peut être tué en un temps plus ou moins court par l'inoculation intrapéritonéale de BCG vivant ou mort, et même de tuberculine purifiée (qui n'est pas préparée avec des cultures BCG) à forte dose. La mort des animaux semble être plus précoce à la suite de l'injection de BCG vivant qu'après BCG mort, tout au moins à forte dose.

L'examen macro- et microscopique des hamsters montre d'abord l'existence d'une forte réaction péritonéale chez les animaux morts peu après l'injection, se traduisant par l'épaississement de l'épiploon et, par la suite, par des adhérences viscérales. On trouve exactement la même réaction chez les cobayes inoculés par voie péritonéale avec des doses assez élevées de BCG (de l'ordre de 20 mg).

La rate est souvent hypertrophiée, plus souvent chez les hamsters inoculés avec du BCG vivant que chez ceux qui ont reçu du BCG mort. Là encore, on se trouve devant une réplique des effets d'une injection péritonéale de BCG chez le cobaye. On peut même trouver, chez le cobaye inoculé avec du BCG dans le péritoine, quelques granulations spléniques et même pulmonaires, fût-ce rarement.

Les frottis des organes de hamsters, morts après l'inoculation intrapéritonéale de BCG, montrent que la rate et le foie peuvent fourmiller de bactilles a. r. Il ne semble pas s'agir d'une multiplication intense des bactilles injectés, car on peut rencontrer le même phénomène chez les hamsters inoculés avec du BCG mort.

Les lésions histologiques qu'on trouve sur les coupes des organes appartiennent au même type, qu'il s'agisse de hamsters inoculés avec du BCG vivant ou mort. Il ne s'agit pas, à proprement parler, de lésions typiquement tuberculeuses. Le tableau est dominé souvent par une invasion de nappes histiocytaires ou épithélioïdes bouleversant la structure de l'organe, et, dans le poumon, la tramite semble surtout dominer la situation. Ces lésions se trouvent aussi bien chez les hamsters inoculés avec du BCG vivant qu'avec du BCG mort. Il est fort probable que la mort des animaux est due au bouleversement de la structure des organes vitaux.

Il est intéressant de rappeler les lésions qu'on trouve chez le cobaye, inoculé dans le péritoine avec du BCG vivant à forte dose (20 mg), trois à quatre semaines après l'inoculation : on peut alors trouver, dans le foie et la rate, des granulations typiques avec cellules épithélioïdes, des cellules géantes et de la

caséification au centre. Chez les cobayes qu'on laisse vivre plus de trois mois après l'inoculation intraperitoneale, toutes les lésions ont disparu, la réaction péritonéale macroscopique aussi bien que les lésions histologiques. Chez le hamster, au contraire, même six à sept mois après l'inoculation de BCG vivant ou mort, on retrouve les mêmes lésions non spécifiques. On a l'impression que le hamster n'arrive pas à se débarrasser des bacilles injectés, vivants ou morts.

Il semble donc s'agir, chez le hamster, non d'une activité pathogène du BCG dans le sens courant du mot, car il ne peut être question de virulence dans le cas de germes morts, mais d'une action toxique. Nous avons déjà remarqué la ressemblance qui existe entre les lésions histologiques trouvées chez les hamsters et celles que l'un de nous a vues chez le lapin inoculé avec des bacilles tuberculeux aviaires ou bovins tués par chauffage. Il s'agissait, là aussi, d'une activité toxique, causant notamment une néphrite toxique chez ces lapins, accompagnée de dégénérescence granuleuse des tubes contournés, ressemblant aux lésions rénales, décrites par Nicod, Hauduroy et Rosset chez quelques-uns de leurs hamsters.

C'est cette sensibilité aux produits de désintégration du bacille acido-résistant qui caractérise le hamster et non une susceptibilité spéciale à la « virulence » du BCG. Cela ressort avec évidence de la sensibilité de cet animal vis-à-vis de la tuberculine.

Le cobaye ne présente pas cette sensibilité. Tous les expérimentateurs savent que les doses de tuberculine qu'il faut employer pour déceler l'allergie chez le cobaye sont supérieures à celles dont on se sert chez l'homme par exemple. C'est pour cette raison que l'inoculation de BCG chez le cobaye permet de mettre en évidence, chez cet animal, des lésions typiquement tuberculeuses et bien circonscrites à l'examen histologique, lésions qui n'évoluent pas et disparaissent sans laisser de traces. Chez le hamster, ces lésions sont moins apparentes, car elles sont noyées par la réaction intense à l'intoxication tuberculinique, réaction longtemps entretenue par la libération progressive des éléments solubles endo-bacillaires des innombrables germes BCG inoculés.

CONCLUSION.

Quand on inocule du BCG vivant ou mort à forte dose dans le péritoine de hamsters, la plupart de ces animaux meurent au cours des mois qui suivent l'inoculation. On observe le même phénomène quand on injecte chez ces animaux de fortes doses de tuberculine purifiée. Il s'agit non pas d'une virulence spéciale du BCG pour le hamster, mais d'une sensibilité prononcée de cet animal pour les produits de désintégration ou du métabolisme du

bacille tuberculeux. Le BCG n'est pas plus virulent pour le hamster que pour le cobaye (*).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. UNGAR. *Nature*, 1942, **150**, 432.
- [2] M. GIROUX. *Laval Méd.*, 1947, **12**, 863.
- [3] H. J. CORPER et M. J. COHN. *Am. J. Clin. Path.*, 1944, **14**, 571.
- [4] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 790.
- [5] L. HUSSEL. *Exp. Veterinärmed.*, 1951, **3**, 49 ; *Z. Bakt. I.*, 1951, **156**, 445.
- [6] U. REUSS. *Zeitschr. Hyg.*, 1951, **132**, 223.
- [7] A. IMAMURA et Y. KAWAMORI. *Rep. Meeting Subcommittee on BCG*, Res Inst. Tub. Lepr., Tohoku Univers., 13 juin 1952.
- [8] T. MUROHASHI et K. YAGANISAWA. *Rep. Meeting Subcommittee on BCG*, Res. Inst. Tub. Lepr., Tohoku Univers, 13 juin 1952.
- [9] J. OKA. *Rep. Meeting Subcommittee on BCG*, Res. Inst. Tub. Lepr., Tohoku Univers., 13 juin 1952.
- [10] F. L. WANG et C. H. MENG. *Chin. Med. J.*, 1951, **69**, 80.
- [11] F. L. WANG. *Chin. Med. J.*, 1951, **69**, 155.
- [12] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 445.
- [13] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *La Presse Médicale*, 1951, **59**, 121.
- [14] J.-L. NICOD, P. HAUDUROY et W. ROSSET. *La Presse Médicale*, 1951, **59**, 605.
- [15] K. BERGER et F. PUNTIGAM. *Zeitschr. Hyg.*, 1953, **137**, 1.
- [16] F. VAN DEINSE et J. SOLOMIDÈS. *Ces Annales*, 1940, **64**, 73.

(*) Nous tenons à remercier notre collègue J. Levaditi qui a bien voulu prêter son concours à l'interprétation des coupes histologiques.

**LE NODULE
DE SURINFECTION ET LE DEGRÉ DE RÉSISTANCE
EN TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE.**
**INCIDENCE RÉDUITE ET ÉVOLUTION RETARDÉE DES NODULES
DE SURINFECTION EN RAPPORT AVEC LE DEGRÉ COLLECTIF
DE RÉSISTANCE CHEZ LES COBAYES VACCINÉS**
PAR LE BCG

par ARMAND FRAPPIER, B. MARTINEAU et MARIA DOBIJA(*)

(Département de Bactériologie de la Faculté de Médecine.
Institut de Microbiologie et d'Hygiène
et Ecole d'Hygiène de l'Université de Montréal.)

INTRODUCTION.

Robert Koch et tous ceux qui ont confirmé le phénomène qui porte son nom ont montré que, chez l'animal déjà préparé depuis plusieurs semaines par une première inoculation de bacilles tuberculeux, l'apparition et l'évolution du nodule de surinfection, à la suite de la réinoculation d'une dose bacillaire suffisamment forte, sont accélérées et accentuées. Contrairement à la lenteur relative des manifestations locales de la primo-infection chez le même animal normal et neuf, c'est en vingt-quatre ou quarante-huit heures qu'apparaissent alors l'inflammation, l'induration, le nodule local et même la nécrose.

Mais, si la dose réinfectante est très faible (de l'ordre de 0,000 001 g au moins) (Courmont et Lesieur [1], Römer [2], Krause et Peeters [3], Debré et Paraf [4], Debré et Bonnet [5], Willis [6], Krause [7], Br. Lange et Lydtin [8], Rich et MacCordock [9], Boquet [10], Lurie [11], Calmette [12], Canetti [13], Rich [14]), les réactions locales et ganglionnaires peuvent ne pas apparaître et la dispersion bacillaire être considérablement retardée. Nasta [15] a observé chez le cobaye que, pour une dose minime ou paucibacillaire de surinfection, la réaction locale, d'abord accélérée au cours de la période initiale d'immunisation, devient retardée quand l'immunité est bien établie. Krause et

(*) Manuscrit reçu le 20 mars 1954.

Peters (*loc. cit.*) avaient constaté que la réaction nodulaire est alors changée dans sa précocité et son évolution.

Lange et Lydtin (*loc. cit.*), Boquet (*loc. cit.*) ont aussi montré que le degré de résistance à la surinfection, manifesté par la réduction d'intensité et même l'absence des lésions locales au point de réinoculation est fonction de divers facteurs quantitatifs, en particulier de la virulence des germes ayant servi à produire la première infection.

De fait, beaucoup de ces expérimentateurs n'ont employé que des souches virulentes pour la première inoculation. La période d'observation des nodules de surinfection se trouvait ainsi limitée à celle de la survie des animaux à la suite de la primo-infection. Ceux qui ont travaillé avec des souches non virulentes de primo-inoculation, telles que R1 et le BCG (Nasta en particulier) ont pu mieux observer l'évolution de ces nodules de surinfection virulente et relier plus nettement ces phénomènes à l'état d'immunité.

Cependant, les relations quantitatives qui font l'objet du présent travail semblent avoir échappé à ces auteurs.

Nous allons montrer en effet que, chez les cobayes préparés par le BCG, l'absence de nodule au lieu de la réinoculation virulente à dose paucibacillaire, n'est la plupart du temps que temporaire. Si on se donne la peine d'observer ces animaux assez longtemps, le nodule apparaît dans un grand nombre de cas et est suivi d'adénites satellites superficielles, et il existe une relation proportionnelle entre la réduction de la fréquence de ces nodules, ou entre le retard de leur apparition ou de leur évolution, et le degré collectif de résistance. Tout paradoxal que ce soit, chez ces animaux, hypersensibilisés et immunisés, ce n'est pas l'accélération de l'apparition du nodule de surinfection qu'on remarque à la suite d'une surinfection paucibacillaire, mais soit une absence totale ou, plus souvent, un retard considérable en relation, semble-t-il, avec le degré collectif de résistance.

L'un de nous avait déjà souligné l'intérêt de cette étude. En effet, Frappier et Denis [16] ont montré, chez des groupes de cobayes vaccinés par des doses de BCG et des voies variées que, d'une part, le pourcentage des animaux qui ne présentent jamais de leur vivant de nodules palpables de réinoculation à une dose virulente minime, et, d'autre part, chez ceux qui en manifestent, la moyenne des jours écoulés avant l'apparition de ces nodules, augmentent en fonction du degré collectif de résistance prévu et réalisé. Chez les témoins non vaccinés les nodules apparaissaient presque constamment sous l'effet de la même dose virulente dans un délai normal bien plus rapproché de l'infection.

Ce travail, à notre connaissance, n'a pas été confirmé et il nous a paru intéressant de le reprendre et d'insister sur certains points

pratiques. En dehors du fait d'appuyer et de préciser les observations des auteurs déjà cités, sur le mécanisme de la résistance en tuberculose, cette démonstration attirerait l'attention des expérimentateurs sur la possibilité, dès le début de la réinfection et du vivant même des cobayes, d'éprouver directement et d'apprécier quantitativement la résistance collective.

Nous avons tenté de provoquer, chez le cobaye, différents degrés de résistance au moyen de BCG cultivé sur milieu de Sauton et âgé de sept jours ou de quatorze jours au moment de la préparation des émulsions.

La numération [17] des unités vivantes dans les émulsions de BCG nous avait permis de constater antérieurement que le BCG provenant de cultures de sept jours sur Sauton contient un plus grand nombre de bactéries vivantes que le BCG de quatorze jours. D'autre part, nous avions déjà observé que, chez l'homme, une émulsion de BCG de sept jours provoque un état allergique plus rapide et plus intense que le BCG de quatorze jours ; que le BCG de sept jours est aussi plus résistant à la congélation et à la dessiccation que le BCG de quatorze jours ; que le BCG de sept jours provoque une réaction locale intradermique plus considérable chez le cobaye que le BCG de quatorze jours. On sait aussi que la tendance actuelle est à l'emploi de BCG plus jeune (de dix à quatorze jours) pour la vaccination des humains.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Nous avons donc constitué trois lots de cobayes de même poids (300 g) provenant d'un même élevage, d'un pelage plutôt pâle, sans toutefois introduire de cobayes blancs. Tous étaient négatifs à la tuberculine à la dose de 0,01 gm. Nous les avons répartis dans des cages par nombres égaux et les avons tenus dans les mêmes conditions, y compris les témoins, depuis les tout débuts de l'expérience.

Après trois semaines d'observation, nous avons vacciné deux lots de cobayes par voie transcutanée, en pratiquant à travers autant de gouttes de vaccin BCG à 60 mg par cm² trois scarifications de 1 cm de longueur de chaque côté de la colonne vertébrale, sur la partie moyenne des lombes, après avoir épilé le cobaye à la main : le lot 1-A, étant vacciné au moyen du BCG de sept jours et le lot 1-B étant vacciné au moyen du BCG de quatorze jours.

Le lot n° 2 était constitué de témoins non vaccinés.

A l'origine, chacun des deux premiers lots était composé de 20 cobayes sur lesquels on avait pratiqué les réactions à la tuberculine à la fin de la première et de la deuxième semaine après

la vaccination, en employant la dose de 0,01 g de vieille tuberculine, par voie intradermique et en notant les pourcentages de sujets positifs dans chaque lot. A la quatrième semaine, les cobayes de chaque lot furent éprouvés par 3 doses décroissantes de tuberculine, 0,001 g, 0,0001 g et 0,00001 g. On enregistrait le nombre de cobayes positifs à chaque dose et notait le produit des diamètres de l'induration.

Les cobayes ayant été vaccinés le 6 décembre 1950 furent éprouvés *exactement trois mois après*, soit le 6 mars 1951, en même temps que les témoins, au moyen d'une dose virulente de 0,0001 mg de bacilles tuberculeux bovins, souche Ravenel, sous le volume de 1 cm³ et inoculés par voie sous-cutanée dans la cuisse droite.

Chaque semaine par la suite, deux observateurs indépendants examinaient soigneusement par la palpation de la région inguinale, les cobayes de tous les lots afin de déceler l'apparition des nodules de surinfection virulente. La palpation était faite aussi du côté opposé pour assurer un meilleur contrôle des impressions subjectives possibles.

Lorsqu'un animal mourait ou était sacrifié, on procédait à l'autopsie dans le plus bref délai et l'on cherchait d'abord à vérifier la présence ou l'absence du nodule d'inoculation et des adénites superficielles, ou profondes. On établissait le degré de tuberculose de la rate, du foie et des poumons, selon le mode décrit ci-dessous, et on procédait à un examen bactériologique d'identification de l'infection en cause.

Nous avons apprécié l'extension des lésions macroscopiques à la surface de *chaque organe* par les notations conventionnelles de 0, 1+, 2+, 3+, 4+.

Le degré moyen de tuberculose organique pour chaque cobaye était exprimé comme suit :

Degré 0. — Aucune lésion visible à l'œil nu sur la rate, le poumon ou le foie ; des adénites sont généralement présentes.

Degré 1. — Des lésions organiques sont visibles macroscopiquement, mais n'intéressent pas la moitié des organes en moyenne.

Degré 2. — La moitié en moyenne des organes est affectée.

Degré 3. — Plus de la moitié en moyenne des organes est affectée.

Le degré collectif de tuberculose organique pour chaque lot de cobayes correspond à la moyenne des degrés individuels.

Défalcation faite des mortalités accidentelles ou par infections intercurrentes qui se produisirent à partir de la date de la vaccination jusqu'à la fin du deuxième mois qui suivit l'inoculation

virulente, les nombres de cobayes suivants sont restés en expérience pour chaque lot :

Lot 1-A	13 cobayes
Lot 1-B	16 cobayes.
Lot 2	26 cobayes.

Au cent quatre-vingt-sixième jour après l'inoculation virulente, lorsque 50 p. 100 des témoins, restés en expérience à partir du deuxième mois après l'inoculation virulente, furent morts de tuberculose, on sacrifia les sujets vaccinés survivants et le reste des témoins.

RÉSULTATS.

A. COMPARAISON DU DEGRÉ D'ALLERGIE PARMI LES DIVERS LOTS DE COBAYES AVANT L'INFECTION VIRULENTE D'ÉPREUVE. — Dès la première semaine, sous l'effet de la dose de 0,01 g de O. T., les cobayes vaccinés par scarifications avec du BCG provenant de cultures de sept jours sur Sauton donnent 85 p. 100 de réactions positives contre 76,7 p. 100 chez ceux qui ont reçu du BCG de quatorze jours par la même voie. La deuxième semaine, tous les cobayes des lots vaccinés sont positifs à cette dose de tuberculine.

A la quatrième semaine, tous les cobayes sont positifs à la dose de 0,001 g de tuberculine. La dose de 0,0001 n'établit pas beaucoup de distinction, mais la dose de 0,00001 donne 19 p. 100 et 10,3 p. 100 de positivité, pour les groupes vaccinés par scarifications avec du BCG de sept jours et de quatorze jours respectivement. L'intensité des réactions à toutes les doses de tuberculine (produit des diamètres de l'induration) est aussi nettement plus forte chez les vaccinés avec du vaccin de sept jours que chez ceux qui ont reçu du vaccin de quatorze jours.

B. LE DEGRÉ COLLECTIF DE RÉSISTANCE. — Les résultats de nos observations sont consignés dans le tableau I.

La moitié des 26 cobayes témoins restant en expérience à partir du deuxième mois après l'infection, sont morts avec des lésions tuberculeuses généralisées entre le soixante-quinzième et le cent soixante-dix-septième jour. Nous en faisons un compte séparé. Aucun vacciné des groupes comptés dans l'expérience à la même époque n'est encore mort.

A la lecture du tableau I, on constate que le lot de cobayes vaccinés avec du BCG de sept jours montre une résistance plus considérable que le lot de cobayes vaccinés avec du BCG de quatorze jours. Le degré moyen de tuberculose, chez les lots 1-A (BCG de sept jours) et 1-B (BCG de quatorze jours) est de 0,54 et 0,94 (moyenne de 0,74) comparativement à 1,81 pour les lots de témoins sacrifiés ou morts dans les mêmes délais. Pour les

raisons données dans notre introduction, on pouvait s'attendre à ces résultats différentiels, que nous avons d'ailleurs confirmés dans une expérience concomitante en employant la voie sous-cutanée : le degré moyen des lésions organiques fut alors de 0,63 pour le BCG de sept jours et de 0,82 pour celui de quatorze jours.

TABLEAU I. — Le nodule de surinfection et le degré de résistance en tuberculose expérimentale.

Lots de cobayes	Age BCG jours	No. cob.	No. cobayes trouvés porteurs de nodules						Degré de tuberculose organique							
			Palpation de l'animal vivant						Cob. sans lésions org.	Degrés indiv. T.B. org. No. cob.			Degré collectif T.B. org.			
			21-50 jrs		51-144 jrs		186 jrs			N	%	N	%	1-	2+	3+
VACCINES.																
Scarifiées	1-A	7	13	1	7.6	1	7.6	4	30.8	9	69.2	1	1	2		0.54
	1-B	14	16	3	18.7	4	25.0	6	37.5	7	43.7	1	4	4		0.94
	MOYENNES :			13.5		16.30		34.15			56.45					0.74
TEMOINS																
Morts - T.B. 75 - 177 jrs.																
	3-A		13	12	92.0	-	-	-	-	0	0	3	6	4		1.92
SACRIFIES	186 jrs.															
	3-B		13	10	77.0	10	77.0	-	-	2	15.4	3	5	3		1.70
	MOYENNES:		26	22	84.6					2	7.7	6	11	7		1.81

C. LA RÉDUCTION DE L'INCIDENCE ET LE RETARD DE L'ÉVOLUTION DES NODULES DE SURINFECTION EN RAPPORT AVEC LE DEGRÉ COLLECTIF DE RÉSISTANCE. — Nous avons consigné le résultat des examens effectués par palpation au point d'inoculation virulente chez tous nos animaux, vaccinés et témoins. Deux observateurs différents se sont contrôlés. Du moment que l'un d'eux constatait la présence d'un nodule dur, ulcétré ou non, du côté de l'inoculation virulente, le cas était compté comme positif. On éliminait ainsi la possibilité de favoriser la démonstration. On n'a pas constaté de nodule du côté opposé.

Nous avons groupé dans les trois périodes de vingt-et-un jours-cinquante jours, de cent cinquante-quatre jours et de cent quatre-vingt-six jours après l'inoculation virulente, les résultats démontrant le nombre absolu et le pourcentage des nodules décelés dans chaque lot de cobayes sacrifiés.

La palpation au cent quatre-vingt-sixième jour fut faite immédiatement avant le sacrifice des animaux et, à l'autopsie de chaque animal, on essaya de vérifier sommairement la présence des nodules proprement dits et des ganglions hypertrophiés

superficiels et avoisinants. Il arrive rarement que, à l'examen *post mortem*, on ne retrouve pas le nodule palpé chez le vivant immédiatement avant le sacrifice. Dans ce cas, le ganglion poplité, enserré et fixé entre les masses musculaires, a pu être pris à la palpation pour le nodule. Mais, avec un peu d'expérience, on évite aisément cette confusion (1).

Période de vingt-et-un-cinquante jours. — Tenant compte de ces observations, si l'on analyse les pourcentages de cobayes qui, pour chaque lot, ont manifesté des nodules à un moment donné, on remarque que ces pourcentages sont de beaucoup plus élevés, dès la période de vingt-et-un-cinquante jours, chez les témoins non vaccinés que chez les animaux vaccinés : une moyenne de 84,6 p. 100 pour les témoins et de 13,15 p. 100 pour les deux lots de vaccinés. A part deux témoins qui ont montré des nodules les trente-sixième et soixante-quatrième jours, tous les autres qui en ont manifesté, l'ont fait dans un délai de trente-six jours, la plupart déjà au vingt-et-unième jour.

Or, nous avons vu que le BCG provenant d'une culture âgée de sept jours confère un état plus élevé de résistance qu'une culture âgée de quatorze jours. L'analyse de l'incidence des nodules de surinfection à cette période confirme amplement et précoce-ment ces différences : le pourcentage s'établit à 7,6 p. 100 dans le cas du BCG de sept jours, contre 18,7 p. 100 dans celui de quatorze jours.

Période de cent cinquante-quatre jours. — Si l'on passe à la deuxième période d'observation des nodules, les pourcentages de nodules positifs n'augmentent pratiquement pas. Il reste toujours une différence notable entre le BCG de sept jours et celui de quatorze jours.

On voit aussi que 92 p. 100 des témoins morts de tuberculose entre le soixantequinzième et le cent soixante-dix-septième jour (lot 3-A) ont montré leurs nodules au cours de la période de vingt et un jours à cinquante jours après l'inoculation virulente, alors que chez 77 p. 100 seulement des témoins ayant survécu, et sacrifiés au cent quatre-vingt-sixième jour en même temps que les vaccinés (lot 3-B), on observe le même phénomène.

Période de cent quatre-vingt-six jours. — À cette période de cent quatre-vingt-six jours, chez les témoins *morts de tuberculo-lose*, on ne retrouve plus que 77 p. 100 de nodules, diminution qui est due au fait que plusieurs de ces nodules se sont abcédés

(1) Nous avons récemment repris ces travaux en injectant la dose de réinfection, non plus dans la région inguinale, mais dans le coussinet plantaire. Les nodules sont alors évidents à la simple observation. Or, les résultats sont superposables à ceux que nous relatons ici et qui sont acquis par la palpation de la région inguinale.

et se sont vidés. Ils n'étaient alors plus décelables au palper. Mais, au contraire, *chez les sujets vaccinés* et, chez ces derniers, surtout dans le lot correspondant à la culture de sept jours, il y a, à cette dernière période, une nouvelle augmentation notable du pourcentage de nodules. Il semble donc certain que, pour une épreuve virulente minime, les sujets doués de plus grande résistance naturelle, mais surtout ceux à qui la vaccination a conféré un plus haut degré de résistance de nature spécifique, mettent plus de temps à former le nodule de surinfection, lorsqu'ils en présentent, que le sujet de résistance naturelle ou spécifique moins grande. Dans le cas de ces derniers, les nodules évoluent plus vite et, dans un certain nombre de cas, se vident, ne sont plus décelables ou restent ulcérés. On notera d'ailleurs qu'un plus grand nombre de nodules abcédés ou ulcérés est décelé chez les sujets témoins que chez les sujets vaccinés. Avec le BCG de sept jours, chez les vaccinés, aucun ulcère, 1 avec le BCG de quatorze jours. Chez les témoins, 4 ulcères, et il est intéressant de constater que ces ulcères sont plus persistants chez les témoins que chez les vaccinés.

De toute façon, au cent quatre-vingt-sixième jour, les différences déjà constatées entre les lots vaccinés avec du BCG de sept jours et du BCG de quatorze jours se maintiennent, mais moins accentuées, et l'écart entre les vaccinés et les témoins, quant à la fréquence des nodules, est encore considérable.

COMMENTAIRE ET CONCLUSIONS.

Il ne fait pas de doute que, dans ces expériences chez le cobaye, la vaccination par le BCG à 60 mg/cm^2 au moyen de 6 scarifications de 1 cm établit un état de résistance qui se manifeste : 1^o par la survie des vaccinés par rapport aux témoins (50 p. 100 de ces derniers sont morts au moment du sacrifice au cent quatre-vingt-sixième jour après l'inoculation virulente) ; 2^o par l'amoindrissement considérable (50 p. 100 environ) du degré moyen des lésions tuberculeuses, chez les vaccinés, amoindrissement qui peut varier proportionnellement au degré de résistance provoqué dans chaque groupe par les artifices expérimentaux ; 3^o par une réduction de la fréquence des nodules de surinfection virulente chez les vaccinés, plus démonstrative au cours des cinquante premiers jours qui suivent cette épreuve, ou par un retard dans l'apparition de ces nodules et une évolution plus lente chez les sujets vaccinés par rapport aux non-vaccinés.

Or, ces signes relatifs aux nodules de surinfection semblent varier quantitativement avec le degré collectif de résistance, apprécié par le degré moyen des lésions organiques. La

démonstration est évidente quand on compare entre eux, à ces points de vue, les lots vaccinés par du BCG provenant de cultures âgées de sept ou de quatorze jours. Le BCG de sept jours confère une résistance appréciablement plus élevée, ce qui est sans doute dû, pour une bonne part, au fait du plus grand nombre de bacilles vivants contenus dans le BCG de sept jours et à la plus grande vitalité de ces bacilles jeunes. D'ailleurs, à dose égale, le BCG de sept jours confère aussi une allergie plus élevée chez l'animal et chez l'homme que le BCG de quatorze jours [47]. Or, la réduction du nombre de nodules de réinoculation virulente, le retard de leur apparition et une évolution moins rapide caractérisent les lots de cobayes vaccinés par du BCG de sept jours, et dès la première période d'observation s'étendant de vingt-six à cinquante jours.

Plus les nodules sont précoce, plus vite ils évoluent vers l'abcédation et l'ulcération ; le phénomène est relativement accentué chez les témoins et dans les lots d'animaux moins résistants.

La réduction de la fréquence des nodules de surinfection, le retard de leur apparition et de leur évolution peuvent donc permettre, lorsque traduits par des chiffres, d'apprécier de bonne heure, après l'épreuve virulente, le degré collectif de résistance, du vivant même des animaux d'expérience, peut-être plus nettement encore que l'appréciation quantitative des lésions à l'autopsie. Des expériences en cours nous permettent d'affirmer que l'injection d'épreuve virulente par voie intra-plantaire, chez le cobaye, constitue une méthode moins subjective que l'injection par voie sous-cutanée, et encore plus rapide et plus facile, en vue d'apprécier l'apparition des nodules de surinfection.

Krause et Peters (*loc. cit.*) affirment que la *production accélérée* du nodule de surinfection est en relation avec le degré de protection. L'inflammation très précoce détruirait la plupart des bacilles ; quelques-uns survivraient, seraient localisés ou focalisés et provoqueraient l'apparition rapide du nodule, cette tenue en échec retardant la dispersion dans les ganglions régionaux.

Cependant, ces auteurs ont observé que, chez l'animal immunisé par des bacilles virulents, la réinfection virulente à dose modérée peut avorter sans rejet de bacilles et que, selon l'importance de cette dose bacillaire, on peut produire toute une gamme de réactions locales accélérées, à partir de la simple inflammation jusqu'à la nécrose.

Comment alors concilier nos observations avec celles de ces auteurs classiques ?

Dans nos expériences, c'est tout au contraire, le silence tissulaire qui est en relation quantitative avec le degré de résistance, paradoxes et contradictions apparents qui sont dus aux interactions de l'allergie et de l'immunité. Chez l'animal sensi-

bilisé et immunisé, surtout par des bacilles virulents, les bacilles de réinfection provoquent une réaction locale accélérée qui peut avorter si la dose réinfectante est plutôt modérée, sans qu'on puisse alors distinguer bien nettement le rôle respectif de l'allergie ou de l'immunité dans ce phénomène. Mais au contraire, les doses paucibacillaires de réinfection chez des sujets immunisés par le BCG et dont le degré d'allergie est plus faible, ne sollicitent pas cette sensibilité, mais elles sont quand même tenues en échec *in situ*, uniquement, semble-t-il, sous l'effet de l'immunité puisqu'elles ne produisent de nodules que dans un délai très retardé, qui dépasse tout ce qu'on a observé antérieurement, et au moment où il est vraisemblable que la résistance diminue. Le silence tissulaire met ainsi en évidence et quantitativement, le seul jeu de l'immunité, sans interposition du masque de l'allergie.

Les expérimentateurs ont ainsi à leur portée, à une période précoce après la réinfection, une épreuve directe, spécifique, facile et quantitative de résistance collective chez le cobaye.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. COURMONT et LESIEUR. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, **64**, 882.
- [2] P. H. RÖMER. *Beitr. Klin. Tuberk.*, 1909, **43**, 1 ; 1910, **47**, 287.
- [3] A. K. KRAUSE et D. PETERS. *Am. Rev. Tuberc.*, 1920, **4**, 551.
- [4] R. DEBRÉ et J. PARAF. *C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 1598 ; 1921, **84**, 15.
- [5] R. DEBRÉ et H. BONNET. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 449.
- [6] H. S. WILLIS. *Am. Rev. Tuberc.*, 1925, **11**, 439.
- [7] A. K. KRAUSE. *Am. Rev. Tuberc.*, 1926, **14**, 211.
- [8] Br. LANGE et K. LYDTIN. *Zeitschr. Hyg.*, 1929, **110**, 209.
- [9] A. R. RICH et H. A. MACCORDOCK, 1929, **44**, 273.
- [10] A. BOQUET. *Ces Annales*, 1933, **50**, 1.
- [11] M. B. LURIE. *J. exp. Med.*, 1936, **63**, 923 ; 1939, **69**, 555 ; 1952, **95**, 119.
- [12] A. CALMETTE. *L'infection bacillaire et la tuberculose*. Paris, 1936, 740.
- [13] G. CANETTI. *L'allergie tuberculeuse chez l'homme*. Paris, 1946, 279.
- [14] A. R. RICH. *The Pathogenesis of Tuberculosis*. Springfield, 1951, 339.
- [15] M. NASTA. *Arch. roum. Pathol. exp.*, 1928, **4**, 541.
- [16] A. FRAPPIER et J. DENIS. *Rev. canad. Biol.*, 1945, **4**, 334.
- [17] A. FRAPPIER, B. MARCIL, M. PANISSET, M. O. PODOSKI et J. TASSÉ. *Rev. canad. Biol.*, 1951, **10**, 182.

EFFETS DE TRAITEMENTS DISCONTINUS A LA STREPTOMYCINE SUR LA MULTIPLICATION *IN VITRO* DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

par E. LEGOCQ, R. DUBOIS et R. LINZ (*).

(*Laboratoire de Bactériologie de l'Université libre de Bruxelles,
Service de Médecine des Enfants et Laboratoire
de Biologie clinique de l'Hôpital Universitaire Saint-Pierre,
Bruxelles.*)

I. — INTRODUCTION.

Les techniques de mesure de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* à la streptomycine souffrent de nombreux défauts (Linz, 1).

Plusieurs auteurs, parmi lesquels Gernez-Rieux et ses collaborateurs, ont montré que les essais pratiqués sur les animaux de laboratoire fournissent des résultats plus conformes à l'évolution clinique des malades que les tests réalisés *in vitro*. Ceci peut s'expliquer, en partie, par l'influence que les cellules et les humeurs exercent sur le complexe bactéries-antibiotiques (Linz et Lecocq, 1).

Mais on doit se demander si les méthodes utilisées *in vitro*, ne sont pas responsables, elles aussi, des écarts constatés. En effet, dans ces méthodes, on soumet habituellement les germes à l'action continue de la streptomycine : celle-ci est incorporée dans le milieu de culture où sont également ensemencées les bactéries. Au contraire, dans les humeurs des malades et des animaux qui reçoivent l'antibiotique en injections espacées, les concentrations varient considérablement d'un moment à un autre. Il est évident que si, par exemple, on trouve dans le sang une concentration résiduelle de l'ordre de 2 à 5 µg par centimètre cube, trois à quatre heures après une injection intramusculaire de streptomycine, moment que l'on choisit d'ordinaire pour le dosage, une concentration beaucoup plus élevée était réalisée une demi-heure ou une heure après l'injection.

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} avril 1954.

Les différences sont encore plus marquées dans le liquide céphalo-rachidien de malades atteints de méningite tuberculeuse traités par des injections intrarachidiennes (Dubois et coll.) ; on trouve, par exemple, 1 000 à 10 000 µg de streptomycine par centimètre cube une ou deux heures après une injection intrarachidienne, et seulement 0,5 à 5 µg par centimètre cube le lendemain. Signalons en outre que des variations de même amplitude se répètent chaque jour, après chaque injection.

Ainsi donc, d'une part, *in vitro*, le bacille de Koch étudié est soumis à l'action continue de la concentration constante et relativement faible de streptomycine introduite dans le milieu de culture ; d'autre part, *in vivo*, il est soumis à un traitement discontinu où les concentrations sont très variables (particulièrement dans le cas des traitements intrarachidiens).

Les conditions étant tellement dissemblables, il est compréhensible que les résultats soient souvent différents. On peut légitimement se demander si là ne se trouve pas l'explication de certaines divergences constatées entre l'évolution clinique et les tests de laboratoire.

Nous avons ainsi été amenés à comparer les effets, sur *M. tuberculosis*, de traitements à la streptomycine, continus d'une part, et discontinus d'autre part. Les deux traitements ont été appliqués *in vitro*, afin de ne pas compliquer cette étude par l'interférence des cellules et des humeurs des animaux d'expérience.

II. — TECHNIQUE.

Le principe de nos expériences est de soumettre *M. tuberculosis* dans un milieu de culture, à l'action de la streptomycine pendant quelques heures, puis de faire passer les germes dans un milieu dépourvu d'antibiotique pendant le reste de la journée ; les deux phases du traitement sont évidemment poursuivies à l'étuve à 38°. Le lendemain, le contact avec la streptomycine est instauré à nouveau pendant une partie de la journée et suivi par une nouvelle incubation en milieu sans antibiotique. Le même cycle est recommandé tous les jours pendant un nombre variable de semaines. Ensuite, on éprouve la vitalité des bactéries en les introduisant une dernière fois dans un milieu exempt d'antibiotique, où ils demeurent quatre semaines sans interruption : ceci nous permettra de voir s'ils sont encore capables de multiplication.

En pratique, la solution de streptomycine a été diluée dans du milieu liquide de Dubos à l'albumine. Dans des essais parallèles, nous avons utilisé ce milieu pur ou additionné de « Tween 80 ». La présence de « Tween 80 » abaisse parfois le seuil bactério-

statique de la streptomycine, mais n'entraîne pas d'autre modification des résultats que nous exposerons plus loin.

Chaque jour, les bacilles ont été maintenus pendant cinq ou six heures dans le milieu avec streptomycine, puis celui-ci était remplacé par un volume égal de milieu de Dubos pur.

Bien entendu, dans des tubes témoins sans streptomycine, on changeait le milieu pur au même moment, et on le remplaçait par d'autre milieu pur.

Dans d'autres tubes, au contraire, nous réalisions un traitement continu. Les bains, additionnés ou non de streptomycine, n'étaient changés à aucun moment de l'incubation, sauf une seule fois, à la fin de l'expérience, où la vitalité des bacilles était éprouvée en les plongeant dans un bain frais de milieu de culture pur.

Dans les séries où les bains étaient changés quotidiennement, nous n'avons par lavé les germes entre deux bains successifs ; aussi des traces de streptomycine sont-elles en réalité introduites dans le liquide « pur ». Cette circonstance ne nous a pas paru une gêne, mais, au contraire, un avantage : elle nous a rapprochés des conditions réalisées en clinique, où les humeurs contiennent encore des traces de streptomycine au moment d'une nouvelle injection du médicament.

Pour pouvoir plonger les bacilles dans les divers bains et les en retirer aisément, il fallait qu'ils fussent fixés sur un support. Nous avons essayé deux méthodes.

Dans la première, 0,2 cm³ d'une culture de *M. tuberculosis* en milieu liquide de Dubos était ensemencé sur un milieu solide (milieu de Löwenstein-Jensen, ou gélose à l'œuf) exempt d'antibiotique. Les tubes étaient laissés en position horizontale pendant quinze à dix-huit heures, puis redressés. Après des périodes de pré-incubation variant d'un à dix jours, on introduisait le « bain » (milieu liquide de Dubos avec ou sans antibiotique) dans le fond des tubes, prudemment, au moyen de pipettes effilées pour éviter d'entraîner mécaniquement les colonies de la surface solide. On submergeait le milieu solide sur la moitié de sa hauteur environ. Cinq ou six heures plus tard, le liquide était aspiré et remplacé par du milieu neuf sans streptomycine. Et ainsi de suite. Malgré toutes les précautions, quelques opérations de ce genre suffisaient pour dénuder complètement la surface solide immergée, même dans les tubes témoins sans streptomycine. La technique n'était donc pas utilisable.

Nous avons alors eu recours à une autre méthode : celle des cultures sur lames, préconisée par Pryce, par Jensen et par Etienne Bernard et Kreis (1). Une manière élégante de réaliser un traitement discontinu *in vitro* a été imaginé par Kreis pour ces cultures : il suffit, en effet, de porter les lames d'un tube conte-

nant du milieu liquide additionné d'antibiotique dans un autre contenant le même milieu sans antibiotique. Mais, dans ce but, les bactéries doivent être soigneusement fixées sur les lames, afin de ne pas s'en détacher. Si elle ne sont pas incluses dans une expectoration ou du pus, Kreis propose de les fixer par l'addition de blanc d'œuf, de gélose-gélatine ou de sérum sanguin ; après dessiccation, les préparations ne se détachent pas dans les bains. A notre avis, le blanc d'œuf et la gélose rendent difficile le stade terminal de la coloration et de l'examen microscopique des lames. Nous avons préféré les globules rouges du sang citraté qui n'offrent pas cet inconvénient : les globules sont, en effet, rapidement laqués par le milieu de Dubos.

Nous avons opéré comme suit : une culture de *M. tuberculosis* de six à dix jours dans le milieu liquide de Dubos avec « Tween 80 » (culture en plein développement) est mélangée avec les hématies du sang humain citraté (0,38 p. 1 000) et glucosé (1 p. 1 000) stérile. La proportion la plus favorable nous a paru être d'une partie de culture pour deux parties de sang. Après agitation, le sang se laque partiellement, sans doute sous l'effet du « Tween 80 ». On dispose, d'autre part, de lames porte-objets, coupées en deux dans le sens de la longueur, introduites chacune dans un tube de 14 à 15 mm de diamètre et de 100 mm de longueur et stérilisées avec lui dans le four. On retire chaque lame de son tube avec des pinces flambées. Au moyen de pipettes Pasteur effilées, on dépose une très petite gouttelette du mélange culture-sang sur la lame et on l'étale uniformément sur toute une surface. On réintroduit la lame dans le tube. On maintient en position verticale et on laisse quatre heures à l'étuve à 38°, puis dans la chambre jusqu'au lendemain. Les préparations sont alors sèches et suffisamment fixées pour résister aux changements de bain. On soumet les germes à une pré-incubation : dans chaque tube, on introduit quelques centimètres cubes de milieu de Dubos pur, sans streptomycine. Après deux jours d'étuve à 38°, on retire chaque lame de son tube, on l'égoutte et on l'introduit dans un autre tube (tube A), de mêmes dimensions, garni au préalable de 4 cm³ de milieu de Dubos. De cette façon, seule la partie inférieure de la lame est immergée, sur une hauteur de 2,5 cm environ ; la partie supérieure sert de témoin à la partie inférieure. Selon le tube, le milieu est utilisé pur (témoin) ou additionné d'une quantité de streptomycine convenable pour que la concentration réalisée soit de 10, 100, 1 000 ou 10 000 µg/cm³. Après cinq à six heures d'étuve, on change de nouveau les lames de bain : on les plonge dans des tubes B, qui contiennent tous du milieu pur. On reporte à l'étuve.

Les mêmes opérations sont recommandées et continuées les

jours suivants. Les tubes A (bains de streptomycine et témoins) sont conservés à la glacière, à 4°, et servent pendant trois à quatre jours ; puis on les remplace par des solutions fraîches qui servent à nouveau pendant trois à quatre jours. Le milieu pur des tubes B est également utilisé pendant trois à quatre jours, puis renouvelé.

Nous avons surtout utilisé la souche E₅ de *M. tuberculosis*.

Nous en possédons trois variants : un variant sensible, inhibé par 0,5 µg de streptomycine par centimètre cube et désigné par E₅ i 0,5 ; un variant résistant à 30 µg/cm³ et sensible à 50 µg/cm³ (E₅ i 50) ; un variant résistant à 500 µg/cm³, mais sensible à 1 000 µg/cm³ (E₅ i 1 000) [mesures par le procédé habituel : milieu de Dubos sans « Tween 80 » ensemencé au moyen de 1/10 de son volume de culture sur milieu de Dubos avec « Tween 80 » âgée de 7 à 10 jours].

Pour chaque variant, nous avons préparé plusieurs lames, chacune étant soumise à l'action discontinue d'une concentration différente de streptomycine. L'expérience a été en outre poursuivie pendant des périodes de temps variables suivant les séries : dans l'une, sept jours ; dans une autre, quatorze jours ; dans une autre encore, vingt-huit jours. Une série témoin a été établie dans le but de déterminer la sensibilité des germes dans le procédé des lames : cette sensibilité n'était connue, en effet, que par le procédé courant, de culture ordinaire. Dans cette série, chaque lame était conservée de façon continue pendant quatorze jours dans le même tube de milieu liquide, additionné ou non de streptomycine ; puis, comme il a été dit ci-dessus, la vitalité des bacilles était éprouvée en portant toutes les lames dans du milieu pur sans antibiotique, où elles restèrent vingt-huit jours à l'étuve.

A la fin de l'expérience, les lames de toutes les séries étaient retirées de leurs tubes et plongées dans de nouveaux tubes contenant de l'eau sur 8 cm de hauteur environ. On chauffait au bain-marie jusqu'à ébullition, et on maintenait l'ébullition pendant cinq minutes. Enfin, on colorait par le procédé de Ziehl-Neelsen et on examinait au microscope.

On peut juger grossièrement de la multiplication en examinant la lame avant cette coloration finale : une multiplication abondante se marque par un feutrage blanc très visible. Mais on voit beaucoup mieux la multiplication sous le microscope, après coloration.

On se souvient que la partie de la préparation, qui reste constamment au-dessus des bains de culture, sert de témoin à l'autre : une simple comparaison suffit pour apprécier le degré de multiplication des germes immergés (voir fig.).

On constate que les bacilles sont plus ou moins isolés, ou groupés en amas. S'ils sont isolés, ou s'ils ne forment que de rares amas de moins de 5 individus, nous admettons qu'ils ne se sont pas multipliés. C'est, en effet, le tableau que présente la partie témoin de la lame, celle qui ne fut pas immergée. Si, au contraire, on rencontre de nombreux amas ou des torsades volumineuses (généralement beaucoup plus de 10 bacilles), la multiplication est certaine. Enfin, s'il n'existe



FIG. 1. — Souche E₅, variant sensible. Culture sur lame (après mélange avec hématies humaines) en milieu de Dubos au « Tween 80 », sans streptomycine. Immersion partielle de la lame. Age de la culture : 14 jours + 28 jours. Coloration de Ziehl-Neelsen. Grossissement environ 1 200 fois. Noter, en bas, la masse sombre, des bacilles qui se sont multipliés abondamment dans la partie immergée de la lame ; en haut, des bacilles épars et relativement rares, qui ne se sont pas multipliés, cette partie de la lame n'étant pas immergée.

que quelques amas de 5 à 10 individus, comme la partie témoin de la lame en montre parfois quelques-uns, il vaut mieux se contenter dans le doute et ne conclure, ni à l'inhibition, ni à la multiplication.

III. — RÉSULTATS.

Les résultats d'une expérience typique figurent dans le tableau.

Nous avons dit que nous cherchions si, après les divers traitements auxquels ils avaient été soumis, les bacilles tuberculeux étaient devenus incapables de se multiplier dans un milieu de culture sans antibiotique. Considérant de ce point de vue la première série de tubes, où l'action de la streptomycine a été

continue, on voit que les concentrations nécessaires sont, même ici, plus élevées que celles qui suffisent à inhiber la multiplication dans la technique « ordinaire ». Par technique « ordinaire », nous entendons celle où les germes ne sont pas fixés sur lames, mais directement introduits dans la masse du liquide, et où la lecture tient compte du trouble des tubes. Les effets inhibiteurs sont obtenus dans l'une et l'autre techniques par les concentrations suivantes :

	TECHNIQUE ORDINAIRE	LAMES PREMIÈRE SÉRIE
E_5 i 0,5	0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	1 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
E_5 i 50	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	100 à 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
E_5 i 1 000	1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	plus que 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

Ceci est conforme aux observations d'Etienne Bernard et Kreis. On peut se représenter que plusieurs conditions rendent moins active la streptomycine dans le procédé des lames que nous avons utilisé : gangue protectrice de sang, accumulation locale des germes qui eussent été dispersés dans un ensemencement en tubes, et surtout, probablement, l'épreuve finale de vitalité qui permet la multiplication de tout bacille qui en est encore capable. En réalité, cette dernière épreuve mesure plutôt le pouvoir bactéricide que le pouvoir bactériostatique de la streptomycine.

Le tableau montre aussi qu'un traitement discontinu, de cinq à six heures par jour, a un effet semblable au traitement continu appliqué dans les mêmes conditions : si l'on excepte peut-être la deuxième série où ce traitement n'est poursuivi que pendant sept jours, l'inhibition de la multiplication des bactéries est obtenue aussi facilement dans les deux procédés.

Cela signifie : 1° qu'il suffit de soumettre les germes à l'action de la streptomycine pendant cinq à six heures par jour, tous les jours pendant deux à quatre semaines, pour les rendre incapables de multiplication ultérieure, quand on les replace dans un milieu exempt d'antibiotique ; 2° que les concentrations de streptomycine nécessaires à cet effet, sont du même ordre de grandeur que celles qui sont indispensables lorsqu'on laisse l'antibiotique en contact constant avec les germes. Or, cette dernière conclusion est en contradiction avec les résultats publiés par Bernard et Kreis : les souches partiellement résistantes (2 à 5 unités par centimètre cube) que ces auteurs ont étudiées ne sont pas inhibées lorsqu'elles ont subi l'action de 15 unités de streptomycine par centimètre cube pendant huit heures par jour. Mais Bernard et Kreis comparent les résultats *sur lames* (et traitement discontinu) avec les résultats obtenus *en tubes* (et traitement continu), tandis que nous-mêmes préférions ne comparer que les résultats obtenus sur lames. Le traitement sur lame exige, comme nous venons de le souligner, environ dix fois plus de streptomycine que le traitement en tubes

pour aboutir à l'inhibition de la multiplication des germes, et il paraît hasardeux de comparer des résultats obtenus par deux procédés aussi différents.

Il faut que le germe soit très résistant (E_5 i 1 000) pour que le traitement discontinu ne l'inhibe pas ; mais alors le traitement

TABLEAU I. — **Effet des traitements continu et discontinu sur la multiplication de *M. tuberculosis*, souche E_5 .**

VARIANTS	Concentr. de strept. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Traitem. continu de 14 j. (1 ^e sér.)	Traitements discontinus pendant		
			7 jours	14 jours	28 jours
E_5 i 0.5	0	++	++	++	++
	0.1	+	++	++	++
	I	±	+	±	0
	10	0	0	0	0
E_5 i 50	0	++	++	++	++
	I	++	++	++	++
	10	+	++	++	++
	100	±	++	±	±
	1000	0	±	0	0
E_5 i 1000	0	++	++	++	++
	10	++	++	++	++
	100	++	++	++	++
	1000	++	++	++	±
	10000	±	++	±	±

Cultures sur lames; lectures après vingt-huit jours d'incubation dans le milieu de Dubos sans streptomycine, qui fait elle-même suite aux traitements indiqués. Degrés de multiplication : 0, pas de multiplication bacilles isolés ou en groupes de moins de 5); ±, multiplication douteuse (quelques groupes de 5 à 10); +, multiplication certaine (amas et torsades de 10 bacilles au moins; amas et torsades nombreux); ++, très nombreux amas et torsades de plusieurs centaines de bacilles.

continu, si l'on se place dans les mêmes conditions d'expérience (sur lames) ne l'inhibe pas davantage. Il faudrait sans doute plus de streptomycine qu'il n'est pratique d'en mettre en solution.

Confrontons à présent les résultats que nous venons d'exposer avec ceux que deux d'entre nous avaient obtenus antérieurement (Linz et Lecocq, 3) : lorsque *M. tuberculosis* estensemencé dans des tubes de milieu liquide de Dubos additionné de streptomycine, l'action inhibitrice de celle-ci devient irréversible après quatre jours d'incubation à 38° (contact continu). Avec la technique des lames et du contact discontinu, l'effet devient également irréver-

sible, mais après quatorze jours (voir le tableau). Il est curieux de constater que le nombre total d'heures de contact nécessaires est semblable dans les deux types d'expérience : environ quatre-vingt-seize heures (quatre fois vingt-quatre heures) lorsque le contact est continu, et soixante-dix à quatre-vingt-quatre heures (quatorze fois cinq à six heures) lorsqu'il est discontinu. Naturellement, il serait prématuré de déduire simplement que les effets des traitements discontinus s'additionnent.

Bornons-nous à constater un fait : l'effet bactériostatique de la streptomycine sur *M. tuberculosis* peut s'obtenir aussi bien par un traitement discontinu que par un traitement continu, et il ne faut pas davantage de streptomycine dans le premier cas que dans le second.

Les observations *in vitro* que nous venons de rapporter, jettent peut-être un jour nouveau sur certaines constatations cliniques demeurées inexpliquées jusqu'à présent.

Nous venons de voir que la multiplication de variants de *M. tuberculosis* relativement résistants peut être incontestablement inhibée si l'on soumet les germes de façon discontinue à l'action de concentrations suffisamment fortes de streptomycine. Or, on sait, d'une part, que parfois des enfants atteints de méningite tuberculeuse guérissent, grâce à la streptomycine, bien que les souches de *M. tuberculosis*, isolées de leur liquide céphalo-rachidien, contiennent une proportion plus ou moins grande de bacilles résistants (Linz, Dubois et Lecocq ; Wilking et coll.). Sous l'action du médicament, ces bacilles résistants eussent dû être seuls à proliférer et eussent dû supplanter les sensibles (Linz et Lecocq, 2), l'affection eût dû devenir réfractaire au traitement et conduire le malade à une mort rapide. Des contrôles soigneux ayant écarté complètement la possibilité d'erreurs ou de confusions, il reste à envisager deux hypothèses pour expliquer la guérison :

- Les souches cultivées au laboratoire n'ont pas la même composition que celles qui infectaient le malade ;
- Elles ne résistent pas aux taux élevés de streptomycine réalisés pendant quelques heures, tous les jours, dans les liquides céphalo-rachidiens des malades.

Quant à la première hypothèse, il est vrai que la mise en culture ou l'inoculation au cobaye peuvent modifier la composition d'une souche de *M. tuberculosis*. Mais le changement s'opère dans le sens opposé à celui qu'il faudrait postuler ici : l'absence de contact avec la streptomycine tend, en effet, à faire disparaître des variants résistants (Linz, 2). Les souches cultivées pourraient donc être plus sensibles à la streptomycine que les souches infectant les malades. Mais c'est le phénomène inverse que l'on constate.

La seconde hypothèse, au contraire, trouve un appui dans les présentes recherches. Les taux de streptomycine dans les liquides

céphalo-rachidiens des malades, sont en effet, beaucoup plus élevés que $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ pendant les premières heures qui suivent l'injection intrarachidienne (Dubois et Linz) : ils atteignent 1 000 et 5 000 μg par centimètre cube, et tombent généralement beaucoup plus bas dans la suite de la journée.

Comme on vient de le voir, des bacilles résistants à $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ mais sensibles à 1 000 μg , par exemple, sont inhibés dans ces conditions, tout au moins *in vitro*. On peut présumer qu'il en est de même *in vivo*, où les cellules et les humeurs contribuent au surplus à la destruction des germes.

Ainsi donc, les présentes expériences peuvent expliquer des faits que nous avons constatés antérieurement, à savoir que des enfants dont les méninges étaient infectées par des bacilles tuberculeux résistant à $100 \mu\text{g}$ de streptomycine par centimètre cube, peuvent guérir sans incidents particuliers, grâce au traitement intrarachidien par la streptomycine. La disparition des bacilles résistants et la guérison des malades sont dues vraisemblablement aux concentrations de l'antibiotique, très élevées, mais de peu de durée, que l'injection locale réalisait chaque jour.

Ajoutons en terminant que l'inhibition de la multiplication de *M. tuberculosis* par des contacts discontinus, mais quotidiens, avec de fortes concentrations de streptomycine, permet de mettre en doute la valeur d'une opinion jusqu'ici implicitement admise : que le traitement des malades doit s'efforcer de maintenir un taux minimum de l'antibiotique dans les humeurs, taux mesuré juste avant l'injection suivante du médicament. Il semble qu'au contraire, les taux utiles sont les taux maximum réalisés aussitôt après l'injection, même s'ils ne durent guère, à condition qu'ils soient fréquemment répétés. Ils expliquent l'inhibition de germes qui résistent cependant aux concentrations minimum trouvées plus longtemps après l'injection.

IV. — CONCLUSIONS.

1^o On savait qu'un contact relativement court (quatre jours) de *M. tuberculosis* sensible avec la streptomycine, inhibe irréversiblement la multiplication de cette bactérie. Un contact discontinu de cinq à six heures par jour, pendant quatorze jours, aboutit au même résultat si les concentrations de la streptomycine sont plus fortes : les bacilles deviennent incapables de proliférer pendant vingt-huit jours au moins après ce traitement.

2^o Des variants relativement résistants de *M. tuberculosis* se comportent de la même façon, à condition d'utiliser des concentrations très élevées de streptomycine. Cependant, si les variants sont extrêmement résistants, ils sont insensibles à la fois au traitement continu et au traitement discontinu.

3° Ces faits impliquent des conséquences pratiques qui sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE

- Et. BERNARD et B. KREIS. 1. *Rev. Tuberc.*, 1949, **13**, 129. — 2. *Ces Annales*, 1951, **80**, 315.
R. DUBOIS et R. LINZ. *Arch. Med. Belg.*, 1950, 371.
Ch. GERNEZ-RIEUX, A. SEVIN et G. CHENET. *Annales Inst. Pasteur Lille*, 1949, **2**, 57.
K. A. JENSEN. *Acta Tuberc. Scandin.*, 1949, **21**, suppl., 42.
B. KREIS. *Ces Annales*, 1951, **80**, 314.
R. LINZ. 1. *Ann. Biol. Clin.*, 1951, 379. — 2. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **146**, 1430.
R. LINZ, R. DUBOIS et E. LECOCQ. In *Les antibiotiques et les maladies de l'enfance*, Paris, 1952, 134-140.
R. LINZ et E. LECOCQ. 1. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 308. — 2. *Ibid.*, 1951, **145**, 149. — 3. *Ces Annales*, 1953, **85**, 451.
D. M. PRYCE. *J. Path. Bact.*, 1941, **53**, 327.
V. N. WILKING, R. L. NEMIR, E. M. LINCOLN et J. D. MARTIN. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **66**, 63.

**ESSAIS COMPARATIFS D'IMMUNISATION
DU RAT BLANC
CONTRE LA BRUCELLOSE EXPÉRIMENTALE
AU MOYEN DE VACCIN VIVANT ET DE VACCIN TUÉ**

par H. JACOTOT et A. VALLÉE (*).
(Aide-Technique : A. LE PRIOL.)

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie animale.)

Dans un travail antérieur nous avons montré que chez le rat blanc, l'inoculation intrapéritonéale d'une suspension de brucelles hautement pathogènes, additionnée de mucine déterminait une toxi-infection brutale entraînant la mort dans de courts délais, le plus souvent, et engendrant, en cas de survie prolongée, d'importantes altérations viscérales et péritonéales (1).

Ces diverses manifestations et, notamment, l'issue fatale dans les jours qui suivent l'inoculation virulente sont des tests d'interprétation facile que nous nous sommes proposé de mettre en œuvre dans les essais de vaccination rapportés ci-dessous.

Nous avons utilisé, isolément ou en association, d'une part, la souche vaccinale B 19 en suspension contenant 10 milliards de germes au cm³, d'autre part une anaculture phéniquée de cette même souche.

Cette anaculture est constituée par une suspension contenant 100 milliards de germes au cm³, qui a été additionnée de 10 p. 100 d'acide phénique au dixième. Après un séjour de 48 heures à la température de 37° la suspension microbienne ne contient plus de germes vivants. L'anaculture a été employée, ou telle quelle, ou après addition de 20 p. 100 d'une solution d'alun de potassium, au dixième.

Précisons tout de suite qu'aux doses adoptées dans ces essais la B 19 et l'anaculture non alunée sont parfaitement supportées par le rat blanc ; au contraire, lorsqu'on ne prend pas de précautions, l'anaculture alunée entraîne chez un certain nombre d'animaux la formation d'abcès aseptiques.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mai 1954.

(1) Ces Annales, 86, 1954, 29.

Nous avons toujours expérimenté sur des rats femelles.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — On forme trois lots de 10, 9 et 9 rats.

Les rats du 1^{er} lot reçoivent chacun, le 28 juin 1951, 0,5 cm³ de la suspension de B 19 diluée au 1/500. La dose pour chaque animal est donc de 10 millions de brucelles vivantes.

Les rats du 2^e lot sont traités de la même façon ; et, en plus, le même jour d'abord, puis deux fois encore, à deux semaines d'intervalle, on injecte à chacun d'eux 1 cm³ d'anaculture non alunée.

Les rats du 3^e lot ne reçoivent pas de brucelles vivantes mais, comme ceux du 2^e lot, trois fois 1 cm³ d'anaculture.

L'épreuve virulente est effectuée le 8 novembre 1951, c'est-à-dire trois mois et demi après les dernières injections d'anaculture et quatre mois et demi après les injections de vaccin vivant. Cette épreuve consiste en l'inoculation intraperitoneale de 0,5 cm³ d'une suspension de *Br. abortus* de pouvoir pathogène caractérisé additionnée de deux parties de mucine au 1/20 (soit 5 milliards de germes).

10 rats neufs sont inoculés comme témoins ; 8 meurent de brucellose suraiguë du 9 au 16 novembre, dont 6 dans les quarante-huit heures ; 1 autre meurt le 13 mars 1952 (quatre mois : amas d'abcès et ensemencement positif) ; le dernier meurt le 13 août 1952 (huit mois : séquelles d'abcès pulmonaires — ensemencement négatif).

Tous les rats vaccinés résistent à l'épreuve.

Deux mois et demi après l'épreuve on sacrifie les 10 rats du 1^{er} lot (vaccin vivant) et les 9 rats du 2^e lot (vaccin vivant + vaccin tué). Chez la plupart d'entre eux on note quelques altérations congestives de la rate, du foie ou du tractus génital ; un animal du 2^e lot présente deux abcès spléniques comme des grains de mil. Les ensemencements effectués à partir de la rate, du foie, du contenu de l'utérus permettent de retrouver la brucelle d'épreuve chez 9 sur 10 des rats du 1^{er} lot et chez 5 sur 9 de ceux du 2^e lot.

Cinq rats du 3^e lot (vaccin tué) sont sacrifiés trois mois après l'épreuve. Ils présentent la même apparence que les précédents ; l'un porte de nombreux petits abcès pulmonaires, un autre un gros abcès d'un lobe. La brucelle est retrouvée chez tous. Les 4 derniers meurent dans les six semaines suivantes ; la cause de leur mort reste imprécise ; 1 seul présente une séquelle pulmonaire suspecte ; les ensemencements sont négatifs pour 3 d'entre eux et positifs pour le 4^e.

Il ressort de ces constatations que, dans le délai d'observation de trois mois, tous les rats vaccinés ont résisté à l'inocula-

tion d'épreuve qui avait tué en quelques jours 8 témoins sur 10. Des résultats donnés par les ensements effectués sur les mêmes animaux sacrifiés ou morts au delà de ce délai il paraît ressortir que l'injection de vaccin tué (en association avec le vaccin vivant dans le 2^e lot ou seul dans le 3^e lot) a favorisé l'auto-stérilisation ultérieure de l'organisme, l'élimination de la brucelle d'épreuve.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — On constitue deux groupes de 6 rats qui tous seront vaccinés avec la culture phéniquée alunée ; mais ceux du premier groupe recevront une fois seulement 5 cm³ de cet anavirus le 27 décembre 1951, tandis que les autres recevront trois fois la même quantité, à dix jours d'intervalle, les 27 décembre 1951, 7 janvier et 18 janvier 1952.

Ces 12 rats sont éprouvés le 25 mars 1952 ; à ce moment ceux du premier groupe sont en bon état d'entretien, les autres, qui ont été vaccinés trois fois, sont atteints de gale généralisée ; en même temps, on inocule 6 rats témoins.

L'épreuve est faite par inoculation intraperitoneale d'une suspension de *Br. abortus* additionnée de deux parties de mucine au 1/20 ; chaque animal reçoit 1,5 cm³ du mélange, soit 4 milliards de germes.

Des 6 rats témoins, 5 meurent de brucellose suraiguë entre le 27 mars et le 4 avril ; le dernier survivra ; sacrifié six mois plus tard, il ne présentera aucune lésion et donnera des ensements négatifs.

Les 6 rats vaccinés en un temps résistent à l'épreuve ; sacrifiés sept mois plus tard, ils donneront tous des ensements négatifs, deux d'entre eux présentant cependant quelques lésions cicatricielles du poumon pouvant être rapportées à l'infection d'épreuve.

Les 6 rats galeux, qui ont été vaccinés à trois reprises, meurent dans des délais compris entre vingt et cinquante jours ; aucun ne présente de lésion, mais chez tous on isole la brucelle d'épreuve (dans la rate, six fois ; dans le foie, cinq fois).

De cette expérience, il se dégage que, chez les rats en bon état d'entretien, une seule injection d'anaculture a parfaitement protégé contre une inoculation d'épreuve pratiquée trois mois après et mortelle dans de courts délais pour 5 témoins sur 6. Il semble bien, au contraire, que chez les rats gravement atteints de gale trois injections successives du même vaccin n'aient engendré qu'une faible immunité, puisque les animaux sont tous morts dans les semaines suivantes, et en état d'infection brucellique.

TROISIÈME ET QUATRIÈME EXPÉRIENCES. — Ces expériences ont été établies sur un seul et même protocole, mais elles comportent

des épreuves successives à des intervalles différents ; nous les avons résumées dans les deux tableaux ci-joints.

TABLEAU I. — A) : E = Ensemencements; B) : L = Lésions.

Epreuve après	Vaccin vivant le 27.3.52	Vaccin tué les 27.3.52 et 16.4.52	Vaccin vivant & Vaccin tué le 27.3.52	Vaccin Vivant le 27.3.52 - Vaccin tué les 7 et 16.4.52	Témoins
7 mois	16 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 abcès pulmonaire.	7 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 4 cicatrices pulmonaires	8 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 2 cicatrices pulmonaires	8 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 cicatrice pulmonaire	8 rats 1) 6 meurent de brucellose, 4 dans les 48 h, 1 après 17 jours, 1 après 2 mois 1/2 ; 2 derniers sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 collection utérine.
8 mois 1/2	10 rats 3 meurent de brucellose dans les 20 jours ; 7 autres sacrifiés 4 mois plus tard. E : 2 positifs. L : 1 abcès pulmonaire, 1 abcès péritonéal.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 4 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 cicatrice pulmonaire	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 4 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 abcès pulmonaire.	4 rats 1 meurt de brucellose après 3 mois ; 3 survivants sacrifiés 4 mois plus tard. E : 1 positif. L : 1 splénomégalie.	10 rats 2) 7 meurent de brucellose dans les 5 jours. 3 survivants sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : aucune.
12 mois	7 rats 4 meurent dans les 40 jours, dont 2 de brucellose confirmée, 3 survivants sacrifiés 6 semaines plus tard. E : 3 positifs. L : aucune	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 semaines plus tard. E : 5 positifs. L : 1 splénomégalie.	7 rats Résistent tous. Sacrifiés 6 semaines plus tard. E : 7 positifs. L : 1 abcès pulmonaire.	6 rats Résistent tous. Sacrifiés 6 semaines plus tard. E : 6 positifs. L : 2 abcès pulmonaires.	10 rats 3) 7 meurent de brucellose dans les 8 jours. Survivants sacrifiés 6 semaines plus tard. E : 3 positifs. L : aucune.

Dans chacune d'elles, les rats répartis en 4 groupes ont été vaccinés comme suit :

Groupe 1 : chaque animal reçoit 0,5 cm³ d'une suspension de B 19 au 1/500, soit 10 millions de germes vivants.

Groupe 2 : chaque animal reçoit en trois fois, à dix jours d'intervalle, 3 cm³ d'anaculture phéniquée non alunée, soit 300 milliards de corps microbiens au total.

Groupe 3 : chaque animal reçoit simultanément et en des points différents 10 millions de germes vivants et 100 milliards de corps microbiens tués par l'acide phénique.

Groupe 4 : chaque animal reçoit d'abord 10 millions de germes vivants, puis dix et vingt jours après, chaque fois, 100 milliards de corps microbiens tués par l'acide phénique.

Les trois premières épreuves ont été communes aux deux expériences.

Il a été observé qu'après chaque épreuve, dès le lendemain, l'état général des témoins était gravement atteint (prostration,

TABLEAU II. — E = Ensemencements; L = Lésions.

Epreuve après	Vaccin vivant le 30.4.52	Vaccin tué les 30.4.52 et 23.5.52	Vaccin vivant et Vaccin tué le 30.4.52	Vaccin vivant le 30.4.52 Vaccin tué les 12 et 23.5.52	Témoins
6 mois	9 rats 2 meurent après 4 et 5 mois, 1'un de brucellose ; 7 survivants sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : aucune.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : aucune.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : sucine.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 abcès pulmonaire.	Voir tableau précédent 1)
7 mois 1/2	10 rats 2 meurent en 5 semaines et 3 mois ; 8 résistent, sacrifiés 4 mois plus tard. P : 1 positif. L : 2 cicatrices et abcès pulmonaire.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 5 mois plus tard. P : 1 positif. L : aucune.	5 rats 2 meurent de brucellose en 3 et 6 semaines ; 3 résistent, sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : 1 péritéritite.	5 rats 1 meurt après 3 semaines. 4 résistent, sacrifiés 5 mois plus tard. E : négatifs. L : aucune.	Voir tableau précédent 2)
11 mois 1/2	9 rats Résistent tous. Sacrifiés 6 semaines plus tard. P : 8 positifs. L : 2 abcès, 1 cicatrice pulmonaire.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 6 semaines plus tard. P : 5 positifs. L : 1 cicatrice pulmonaire.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 6 semaines plus tard. P : 5 positifs. L : 1 abcès pulmonaire et 1 abcès ovarien.	5 rats Résistent tous. Sacrifiés 6 semaines plus tard. P : 5 positifs. L : 1 abcès ovarien.	Voir tableau précédent 3)
15 mois	3 rats Meurent de brucellose dans les 3 jours.	5 rats 4 meurent de brucellose dans les 10 semaines ; 1 résiste, sacrifié 4 mois plus tard. E : positif. L : splénomégalie.	2 rats 1 meurt en 6 semaines. E : négatif. L : aucune.	3 rats meurent de brucellose dans les 3 mois. 1 résiste, sacrifié 4 mois plus tard. E : positif. L : aucune.	6 rats 4 meurent de brucellose dans les 10 jours. 2 résistent, sacrifiés 4 mois plus tard. E : 1 positif. L : 1 splénomégalie.

horripilation générale, inappétence) ; ces signes s'atténuaien plus ou moins lentement chez ceux qui devaient survivre.

Tout au contraire, et ceci était frappant, les vaccinés conservaient pour la plupart leur habitus inchangé ; seuls réagissaient plus ou moins fortement ceux qui devaient succomber ultérieurement ou présenter après le sacrifice de grosses lésions.

Le dépouillement de ces résultats permet de chiffrer, dans une certaine mesure, la valeur des vaccinations mises en œuvre. On constate ainsi que dans l'année qui a suivi l'injection des vaccins les animaux ont résisté aux épreuves virulentes dans les proportions suivantes :

Premier lot (vaccin vivant)	50/61 = 82	p. 100
Deuxième lot (vaccin tué)	32/32 = 100	p. 100
Troisième lot (vaccin vivant et vaccin tué simultanément)	33/35 = 94,5	p. 100
Quatrième lot (vaccin vivant et vaccin tué successivement)	31/33 = 94	p. 100
Témoins	8/28 = 28,5	p. 100

D'autre part, parmi les survivants, la proportion de sujets, présentant, lors du sacrifice, des lésions imputables à l'épreuve brucellique, s'est trouvée du même ordre de grandeur dans tous les lots de vaccinés (18 à 22 p. 100).

Chez les survivants encore, la constatation suivante est intéressante : d'une manière générale, cinq semaines après l'épreuve tous hébergeaient la brucelle ; quatre mois après cette épreuve, rares au contraire étaient les animaux qui donnaient des ensements positifs et, cinq mois après l'épreuve, tous avaient effectué leur autostérilisation ; ces observations sont valables pour les témoins.

Enfin, la conclusion pratique de ces deux expériences peut se formuler ainsi :

1° Quel qu'ait été le protocole, les effets de la vaccination se sont manifestés pendant un an ; trois mois plus tard, ils n'étaient plus appréciables (mais alors les observations n'ont porté que sur un tout petit nombre de sujets).

2° Les injections de vaccin tué se sont révélées d'une efficacité certaine, au moins égale, dans l'ensemble, à celle du vaccin vivant.

CONCLUSION.

L'injection aux rats blancs d'une anaculture phéniquée (B 19) leur permet de résister à une inoculation d'épreuve mortelle en des délais généralement courts pour plus des deux tiers des témoins.

L'immunité dont bénéficient les rats ainsi vaccinés se maintient pendant une année. Elle ne le cède en rien à celle qui suit l'inoculation du vaccin vivant de même souche (B 19).

Ces constatations sont en contradiction avec la notion qui a longtemps prévalu de l'inefficacité des vaccins tués en matière de brucellose. Elle légitime l'emploi des méthodes d'immunisation basées sur l'administration simultanée de vaccin vivant et de vaccin tué, méthodes dont la valeur a été expérimentalement établie déjà chez le cobaye (M. Lisbonne, G. Roman, L. Carrère, H. Quatrefages, G. Renoux).

A PROPOS DES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES PAR LES PHAGES (*).

I. — OPÉRATIONS PRÉLIMINAIRES ET IDENTIFICATION PROPREMENT DITE

par R. WAHL et J. FOUACE.

(*Institut Pasteur.*)

Les diverses opérations nécessaires pour préparer et effectuer l'identification des souches de staphylocoques par les phages doivent être standardisées pour que les résultats obtenus soient comparables entre eux.

Après les travaux de Fisk [1] et ceux de Wilson et Atkinson [6], Wahl et Lapeyre-Mensignac [4] ont proposé l'adoption de certaines techniques. Depuis nous y avons apporté quelques modifications et nous pensons qu'il est utile de reprendre la description de l'ensemble des opérations, en indiquant les raisons de ces modifications.

R. E. O. Williams et J. E. Rippon [5], dans un important mémoire, ont également décrit leur technique, qui diffère de la nôtre sur quelques points que nous discuterons.

I. — MILIEUX DE CULTURE.

Nous utilisons trois milieux, dont chacun correspond à des usages différents : le bouillon gélosé à forte concentration de gélose, pour l'entretien des souches ; l'eau peptonée glucosée, pour la préparation des lysats ; l'eau peptonée gélosée à faible concentration de gélose, pour le titrage des phages, pour la détermination des dilutions à utiliser et pour l'identification des souches proprement dites.

1° *Le bouillon gélosé à forte concentration de gélose (2,5 p. 100)* est préparé avec un mélange à parties égales de liquide de digestion peptique de viande et de macération de viande. Il est utilisé en tubes inclinés. Il est réparti, précipité et filtré suivant la technique habituelle. Ce milieu a été choisi pour l'entretien des souches parce qu'il est moins favorable qu'un milieu liquide à la

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} avril 1954.

production des phages par les souches lysogènes de staphylocoques. En particulier, les lyses spontanées des cultures que l'on observe à certains moments sous des influences encore inconnues s'y produisent moins souvent.

2° *L'eau peptonée glucosée* contient 2,5 p. 100 de peptone (1) et 0,2 p. 100 de glucose. Elle sert à la préparation des lysats parce qu'elle est plus favorable que le bouillon à la multiplication de certains phages.

3° *L'eau peptonée gélosée à faible concentration de gélose* (1,2 p. 100) doit être préparée avec une peptone toujours de même marque (1) adoptée une fois pour toutes, et autant que possible avec le même stock, aucune marque ne garantissant une fabrication constante. En effet, nous avons vérifié que la densité et l'aspect de la couche microbienne et surtout le nombre et la taille des plages diffèrent suivant la peptone utilisée. Il est probable que la qualité de la gélose a aussi son importance. Nous n'avons pas fait de recherches à ce sujet. Nous n'ajoutons ni calcium, ni glucose à l'eau peptonée gélosée parce que, avec la peptone et la gélose que nous utilisons, l'addition de calcium ne change pas les réactions du phage (la concentration de ce cation est probablement suffisante dans le milieu), et que l'addition de glucose paraît inhiber légèrement la lyse et augmenter l'amplitude des variations des résultats pour une même souche et un même phage. Le milieu est précipité à 120°, filtré, réparti en tubes de 22 × 2,2 (en flacons la dessiccation est trop rapide). Le temps de stockage ne dépasse pas huit jours en tubes bouchés au coton et un mois en tubes capuchonnés.

Ce milieu convient pour le titrage des phages, la détermination des dilutions à utiliser et l'identification des souches. Les plages y sont plus nombreuses et mieux visibles qu'en bouillon gélosé parce que notre eau peptonée est plus favorable à la multiplication des phages que notre bouillon et que la couche microbienne n'y atteint pas une aussi grande épaisseur. La faible concentration de la gélose est également favorable.

II. — PRÉPARATION DES PLAQUES DE GÉLOSE POUR LE TITRAGE DES PHAGES ET L'IDENTIFICATION DES SOUCHES.

L'eau peptonée gélosée sert à préparer ces plaques en boîte de Petri. Leur épaisseur et leur degré d'hydratation ont une influence certaine sur le nombre et la taille des plages.

L'épaisseur des plaques doit donc être constante. Nous l'avons fixée à 0,5 cm, ce qui correspond à 25 à 30 cm³ de gel pour une boîte de Petri de 10 cm de diamètre.

(1) Nous avons adopté une marque de peptone française qui nous donne des résultats satisfaisants.

Le degré d'hydratation des plaques dépend d'abord du mode de préparation du milieu gélosé et de la façon dont il est coulé dans les boîtes. La préparation du milieu, indiquée plus haut, doit donc être observée rigoureusement dans tous les détails pour que les résultats soient cohérents.

La façon dont l'excès d'eau des plaques de gélose est soumis à l'évaporation est également très importante. La température à laquelle cette opération s'effectue, sa durée, le degré hygrométrique, la ventilation et le volume de l'enceinte où elle s'effectue doivent être standardisés autant que possible.

Deux méthodes ont été utilisées : *a)* évaporation en boîte fermée et retournée (couvercle en bas) à 37°, pendant quarante-huit heures, en décollant les couvercles deux ou trois fois ; *b)* évaporation en boîte ouverte, pendant une demi-heure à 37°. Mais, dans les deux cas, un facteur reste variable : le degré hygrométrique de l'atmosphère de l'étuve.

L'expérience a montré que les deux méthodes donnent des résultats équivalents ; mais qu'avec les deux, on a des variations d'hydratation telles que la « dilution critique » peut varier du simple au double ou au quadruple, pour un même lysat. Ces variations paraissent dues à des différences minimes dans la façon dont la gélose est coulée dans les boîtes, car elles existent entre différentes plaques préparées en même temps avec la même gélose et desséchées dans la même enceinte et elles sont du même ordre que celles que l'on constate entre différents échantillons de gélose préparés à des dates différentes.

III. — LYSATS.

1^o PRÉPARATION DES LYSATS. — Les lysats doivent répondre à deux exigences : ne contenir qu'une faible proportion de phages produits par la souche de propagation et avoir un titre très élevé. La raison de la première condition est évidente. La seconde est imposée, comme nous le verrons dans une prochaine publication, par le système de dilutions que nous avons adopté.

1^o Pour n'avoir dans un nouveau lysat que le *minimum de phages produits par la souche de propagation*, il faut d'abord que le lysat ancien qui sert à le préparer soit utilisé à une dilution assez forte pour qu'il n'en contienne pas, ce qui est possible seulement s'il a un titre élevé. Il faut aussi que la souche de propagation ne soit pas dans une phase de production abondante de phages.

A ce propos, rappelons que la production de phages dans les cultures de souches lysogènes de staphylocoques, production qui est faible la plupart du temps, devient à certains moments très abondante et qu'alors la souche donne une culture très maigre et d'aspect spécial (fig. 1) ou une culture qui se lyse spontanément.



FIG. 1. — Culture présentant des lacunes diffuses, mal limitées, indiquant une lyse incomplète par le phage produit par la souche. Remarquer également une lyse totale, au niveau d'une goutte d'un autre phage, déposée sur cette culture.

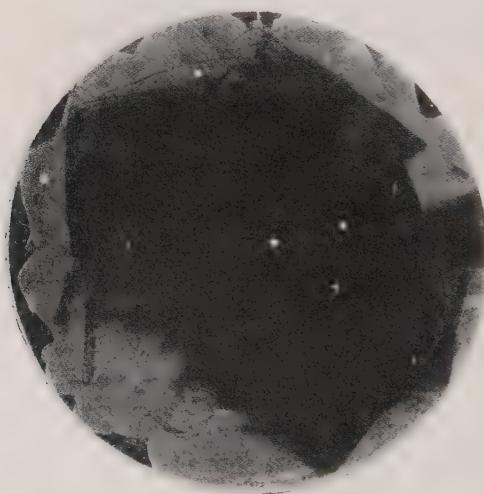


FIG. 2. — Lyse spontanée d'une culture par le phage produit par les bactéries de la souche. Dans la zone centrale, lyse totale; à la périphérie, des zones non lysées et d'autres criblées de plages.

ment (fig. 2). C'est pour cette raison que Wilson et Atkinson, Williams et Rippon ont conseillé de préparer des lysats sur milieux gélosés, en réservant à la partie périphérique de la couche microbienne une zone sans phages. Si dans celle-ci les bactéries poussent normalement, ils considèrent que la production actuelle de phages par la souche est négligeable. Nous pensons que cette technique n'offre pas de sécurité réelle, car on peut observer sur une culture de staphylocoques sur gélose, une lyse totale spontanée sur presque toute la surface de la couche bactérienne, à l'exception précisément d'une bande assez large de sa partie périphérique (fig. 2).

La préparation des lysats en milieu liquide a l'avantage, tout en donnant régulièrement des titres élevés, d'être plus simple et plus sûre, à condition d'avoir une culture témoin sans phage, et de n'utiliser le lysat que si celle-ci, suivie régulièrement, ne présente à aucun moment de lyse spontanée et atteint une opacité normale dans les délais normaux.

2° Pour obtenir le titre maximum pour chaque phage on procède de la façon suivante :

On fait, à partir d'une culture de dix-huit heures de la souche de propagation sur bouillon gélosé à 2,5 p. 100 une suspension de bactéries en eau physiologique. Avec cette suspension, on ensemence l'eau peptonée glucosée de façon qu'elle contienne 3×10^7 bact./cm³ (évolution par opacimétrie). Après une heure à l'étuve à 37°, on introduit le phage. Les quantités de phages à introduire pour obtenir le titre maximum sont déterminées une fois pour toutes pour chaque phage, après des essais préalables (Wahl et Lapeyre-Mensignac [4]). Elles diffèrent suivant le phage (2). Chaque tube est accompagné d'un témoin ensemencé en même temps avec le même nombre de bactéries. On laisse à l'étuve et on guette l'apparition de la lyse. Dès qu'elle se produit (en général, quatre heures après l'addition du phage), on transporte le tube à la glacière. Mais, de toute façon, on ne prolonge pas le séjour à l'étuve au delà de cinq heures, et on met au bout de ce temps le tube à la glacière. Si la lyse ne s'était pas produite à l'étuve, elle se produit à la glacière, et elle est le plus souvent complète le lendemain. Sinon on centrifuge.

3° Pour stériliser les lysats, on n'utilise pas la filtration, pour éviter des diminutions de titre parfois très grandes.

Dès que la lyse est terminée, ou après la centrifugation si elle est nécessaire, on introduit un cristal de thymol dans le tube. Après un temps variant de quatre à douze jours de séjour à la glacière avec le thymol, le milieu est stérile, ce qu'on vérifie. Dès ce moment, le lysat peut être utilisé. Il faut savoir que

(2) La concentration en phages au départ varie de 2×10^4 à 2×10^6 /cm³, suivant les phages.

I goutte de lysat thymolé non dilué, déposée sur un ensemencement de bactéries sur gélose, peut produire une zone d'inhibition due au thymol et simulant une lyse bactériophagique, mais que la dilution au 1/4 suffit à éliminer cette réaction.

2° TITRAGE DES LYSATS. — Les titrages se font sur les plaques de gélose préparées dans les conditions précisées plus haut. De plus, la concentration des bactéries à la surface de la gélose, la température et le temps d'incubation exercent aussi une influence sur le nombre et la dimension des plages. Tous ces facteurs doivent donc avoir la même valeur pour tous les titrages des lysats et pour les identifications proprement dites. Nous les indiquerons plus bas à propos de celles-ci.

Pour le titrage, on dépose sur la culture des gouttes de phages (de 1/30 de centimètre cube) non dilué et dilué à 10^{-2} , 10^{-4} et 10^{-6} . Pour être utilisable, un lysat doit donner au moins 10 plages avec 1/30 de centimètre cube (3) de la dilution 10^{-6} , c'est-à-dire titrer 3×10^8 phages/cm³. C'est ce qu'on obtient, par la technique indiquée, avec les phages qui se multiplient le moins bien. Avec les autres on obtient des titres de 10^9 à 10^{10} phages/cm³.

Les erreurs dues à la dilution des phages pour le titrage sont négligeables. En effet, sur 11 souches sensibles, on a fait trois séries de dilutions du même phage sur la même plaque de gélose avec les mêmes résultats.

3° DÉTERMINATION DES DILUTIONS CRITIQUES. — C'est la plus petite dilution qui produit une lyse totale. Williams et Rippon [4] font des dilutions suivant une progression géométrique de raison 10^{-1} ou 2×10^{-1} et choisissent parmi elles la dilution critique. Nous préférerons faire des dilutions plus rapprochées, une première dilution au 1/100 sert à préparer les suivantes. Celles-ci sont faites suivant une progression géométrique de raison 1/2. Seuls les lysats donnant au moins une lyse totale au 1/100 sont utilisés (4). Mais, comme nous allons le voir, il nous paraît préférable d'abandonner les dilutions critiques.

4° CONSERVATION DES LYSATS. — Les lysats non dilués sont conservés à la glacière avec un cristal de thymol. Au contraire, les lysats dilués et destinés à être employés sans nouvelle dilution (aux dilutions critiques, par exemple) sont conservés sans thymol.

Nous avons constaté que les titres des lysats, non dilués ou dilués, de tous les phages classiques utilisés couramment se

(3) C'est-à-dire 1 goutte d'une pipette calibrée en conséquence.

(4) Les dilutions critiques varient suivant les phages : en général, du 1/100 au 1/6 400 ; elles atteignent pour certains (beaucoup plus rarement) le 1/12 800 et 1/25 600.

conservent actuellement pendant plusieurs mois à la glacière. Le titre est d'ailleurs vérifié périodiquement et s'il baisse nettement, on refait un nouveau lysat ou une nouvelle dilution. Or, il y a quelques années, les titres de plusieurs de ces phages baissaient rapidement, et davantage en eau peptonée qu'en bouillon [4]. Nous pensons que ces phages se sont stabilisés au cours des années, de la façon suivante.

Après de longues périodes de conservation des lysats à la glacière, un petit nombre de phages a survécu. Ceux-ci étaient probablement plus stables que les phages qui s'étaient inactivés ; en les faisant multiplier sur la souche de propagation, on obtenait un nouveau lysat dont les phages étaient dans l'ensemble plus stables. En répétant plusieurs fois cette opération, on a obtenu finalement une race de phages stable.

Nous avons observé d'ailleurs le même processus pour les nouveaux phages que nous avons isolés à partir de souches lysogènes insensibles aux phages classiques [2]. Ils étaient très instables au début, et nous avons pu les stabiliser en les conservant à la glacière pendant des périodes de plusieurs semaines après chacune desquelles on les avait fait multiplier sur leur souche de propagation.

Ce comportement paraît donc être commun à tous les phages issus de souches lysogènes de staphylocoques et peut-être d'autres espèces bactériennes.

5^e CHOIX DES DILUTIONS A UTILISER POUR L'IDENTIFICATION. — Cette question sera étudiée en détail dans une seconde publication à laquelle nous renvoyons [3].

IV. — IDENTIFICATION PROPREMENT DITE.

1^e Concentration des bactéries dans la suspension étalée à la surface de la gélose. — Cette concentration a une répercussion sur les dimensions et parfois sur le nombre des plages, comme le montrent des essais que nous avons faits, par exemple, pour déterminer la dilution critique du phage 54, avec diverses concentrations de sa souche de propagation. En étalant V gouttes de suspension contenant diverses concentrations de bactéries, on constate que la dilution critique est maxima (c'est-à-dire que la taille des plages est maxima) quand les bactéries, dans la suspension étalée sur la gélose, ont une concentration de $3 \times 10^8/\text{cm}^3$, ou toute concentration inférieure suffisante pour obtenir une couche bactérienne continue. Il en est de même dans certains cas pour le nombre des plages. Nous utilisons donc des suspensions contenant 3×10^8 bact./ cm^3 .

2^e Mode d'étallement des bactéries. — Pour une même quantité de bactéries étalées, le mode d'étallement n'a aucune influence sur

les dimensions et le nombre des plages, au moins en ce qui concerne la comparaison entre un ensemencement avec V gouttes de suspension bactérienne réparties avec un étaleur de verre, et un ensemencement avec un excès de culture, qu'on laisse sécher une demi-heure à 37°.

Les variations semblent cependant un peu plus grandes avec cette deuxième technique (pour les dilutions critiques : variation de 3 dilutions consécutives au lieu de 2).

3^e *Dépôt des gouttes de phage.* — I goutte de chaque lysat, convenablement dilué, est déposée à la surface de la gélose, sans la toucher, avec une pipette capillaire tenue verticalement.

4^e *Température et durée d'incubation des cultures.* — Elles doivent être choisies en fonction l'une de l'autre et en raison inverse l'une de l'autre, de façon que la couche microbienne soit assez dense pour faire ressortir les plages, mais que la culture secondaire qui en occupe le fond soit assez discrète pour ne pas les effacer.

Deux méthodes peuvent être employées : incubation pendant quatre à six heures (en fait, cinq heures) à 37°, ou pendant dix-huit heures à 30°.

a) Avec les deux méthodes, les variations inévitables dans le nombre et la taille des plages, variations dues aux différences d'hydratation de la gélose, sont de même ordre.

b) Pour certains phages, les plages sont plus nettes et plus nombreuses à 30° (ceci a été constaté avec le phage 29 sur la souche 428 et avec le phage 841/838). Pour d'autres phages (735 A/468), les plages étaient plus nettes et plus nombreuses à 37°.

Par conséquent, on peut choisir l'un ou l'autre des deux systèmes, mais il faut en adopter un une fois pour toutes et l'utiliser aussi bien pour les titrages, le choix des dilutions et l'identification proprement dite.

5^e *Notation des résultats.* — L'utilisation de phages peu dilués permet de ne pas tenir compte des attaques comportant moins de 10 plages. On indique l'intensité des attaques en utilisant la notation indiquée dans un travail précédent [4].

LECTURE DES RÉSULTATS.

Les plaques de gélose sont examinées au-dessus d'un fond noir avec un éclairage oblique donné par une source de lumière diffusée. Une forte loupe est souvent nécessaire pour voir les plages qui sont parfois très petites.

Généralement, les plaques sont examinées par transparence à travers le fond de la boîte de Petri. Mais certaines lyses incom-

plètes sont mieux visibles à l'examen de la surface de la gélose, à jour frisant, le couvercle étant enlevé.

On fait deux lectures successives à vingt-quatre heures d'intervalle.

La première lecture se fait dix-huit heures environ après le dépôt des phages sur la culture. Si l'incubation a été faite à 37° pendant cinq heures, les boîtes sont laissées au laboratoire, à 20° environ, jusqu'à la lecture. Si l'incubation a été faite à 30° pendant dix-huit heures, la première lecture est faite au sortir de l'étuve. La seconde lecture est faite vingt-quatre heures après la première. Elle est nécessaire parce que certaines attaques n'apparaissent qu'à ce moment.

Par exemple, sur 1 062 attaques observées sur 100 souches prises au hasard et typées plusieurs fois (à des dilutions allant du 1/10 à la dilution critique), 75 attaques de plus de 10 plages, soit 7 p. 100, n'ont été visibles qu'à la seconde lecture. Parmi celles-ci 53 avec 10 à 50 plages, 22 avec 100 plages et plus. Six souches ont été identifiées seulement à la seconde lecture. La fréquence de ces apparitions tardives n'était pas la même pour tous les phages. Elle était de 21 p. 100 pour 42 B, de 10 à 15 p. 100 pour les phages 3 A, 6, 42 C, 44, 44 A ; de 5 à 10 p. 100 pour les phages 3 B, 7, 42 D, 47 A, 47 B, 52 A, 53, 54 et de 2 à 5 p. 100 pour les phages 3 C, 29, 42 D, 47, 47 C, 51, 52.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1^o Trois milieux de culture différents sont utilisés : le bouillon gélosé pour l'entretien des souches, l'eau peptonée glucosée pour la préparation des lysats, et l'eau peptonée gélosée qui sert à préparer des plaques de gélose pour le titrage des phages et l'identification des souches.

2^o Les plaques de gélose doivent être préparées avec des précautions spéciales pour obtenir une épaisseur et un degré d'hydratation aussi constant que possible. Ces précautions sont indiquées plus haut.

3^o Les lysats doivent ne contenir que le minimum de phages produits par la souche de propagation et avoir un titre élevé. Ils sont préparés en milieu liquide à 37°, où la culture est laissée pendant le temps minimum nécessaire pour la lyse ; puis ils sont stérilisés et conservés avec du thymol.

4^o Pour l'identification proprement dite, les indications nécessaires sont données plus haut, concernant la concentration des bactéries à la surface de la gélose, le dépôt des gouttes de phages, la température et le temps d'incubation.

5^o La lecture des résultats est faite à deux reprises, à vingt-quatre heures d'intervalle.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. T. FISK. *J. infect. Dis.*, 1942, **71**, 153 et 161.
- [2] R. WAHL et J. FOUACE. Ces *Annales*, 1954, **86**, 161.
- [3] R. WAHL et J. FOUACE. Ces *Annales*, 1954, **87** (*sous presse*).
- [4] R. WAHL et P. LAPEYRE-MENSIGNAC. Ces *Annales*, 1950, **78**, 353.
- [5] R. E. O. WILLIAMS et J. E. RIPON. *J. Hyg.* 1952, **50**, 320.
- [6] G. S. WILSON et T. B. ATKINSON. *Lancet*, 1946, **1**, 647.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DU SÉRUM DES RONGEURS

par S. ARBOUYS, J. FINE et A. EYQUEM (*).

(*Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins.
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.*)

L'étude électrophorétique du sérum de divers animaux a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Les valeurs normales du chien ont été établies par Lewis et par Deutsch. Le cheval, le porc, la vache, le mouton, la chèvre, le renard, le chat, le lapin, le cobaye, le rat, le singe ont fait l'objet des examens de Deutsch puis de Edsall.

Depuis le perfectionnement des techniques de microélectrophorèse sur papier, par Durrum, par Grassmann et Hannig, par Macheboeuf et Rebeyrotte, on peut réaliser cet examen à l'aide de petites quantités de sérums.

Pour établir les constantes électrophorétiques normales chez ces divers rongeurs, nous avons étudié le sérum de 30 rats, 10 mérions et 8 souris. Nous avons ensuite recherché les modifications électrophorétiques lors de l'immunisation de 13 rats par des extraits d'organes (foie et pancréas d'autres rongeurs) (cobaye et mérion).

Nous avons, de plus, examiné le sérum de 6 rats chez qui nous avons créé une anémie hémolytique expérimentale par injection d'un immun-sérum de lapin anti-globules rouges de rat.

TECHNIQUE.

Les bandes de papier (Schleicher et Schull, n° 2045 a) sont horizontalement tendues entre deux cuves de tampon au véronal (pH 8,6) et soumises pendant treize heures à un courant continu de 160 volts (pour une longueur de bande de 25 cm) dont l'intensité est réglée à 0,5 milliampère par bande de 4 cm de large. On dépose à la pipette un nombre de millimètres cubes de sérum déterminé par la teneur en protéines totales de ce

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mai 1954.

sérum, suivant un trait de 3 cm perpendiculaire à l'axe de la bande et à 7 ou 8 cm de la cuve cathodique.

Après coloration par l'« amido-schwarz 10 B », et élimination de l'excès de colorant par passage dans des bains successifs d'alcool méthylique, la bande rendue transparente est passée

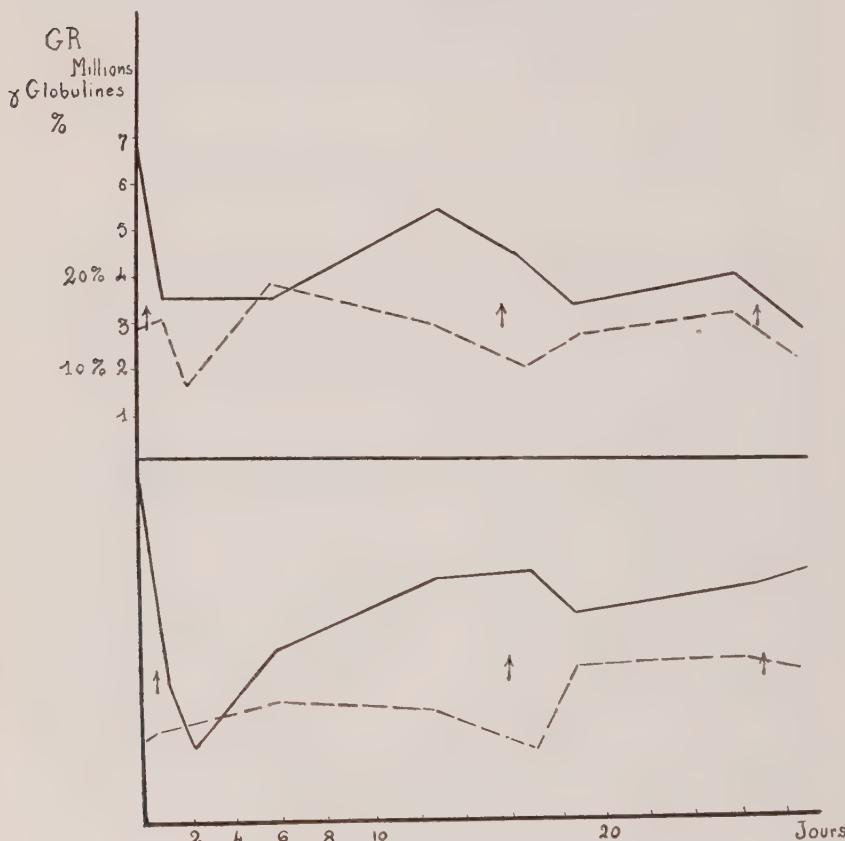


FIG. 4.

dans un *électrophotomètre*, selon la technique de Grassmann, Hannig et Knedel.

En portant en abscisse les millimètres de déplacement et en ordonnée les densités optiques, on obtient une courbe qui peut être planimétrée, et dont les différentes fractions peuvent être exprimées en pourcentage.

I. — CONSTANTES ÉLECTROPHORÉTIQUES NORMALES
CHEZ LE RAT, LE MÉRION, LA SOURIS.

La microélectrophorèse sur papier du sérum de 30 rats, 10 mérions, 8 souris nous a permis de calculer la moyenne exprimée en pourcentage des différentes fractions protéiniques du sérum de ces trois espèces de rongeurs (voir tableau I).

Ces moyennes montrent que chez ces trois rongeurs, le tracé

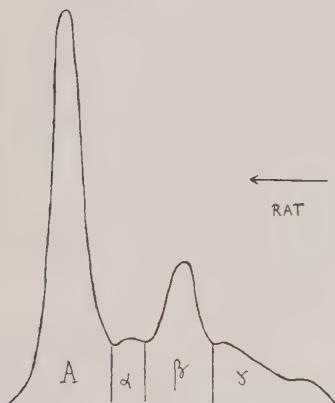


FIG. 2.

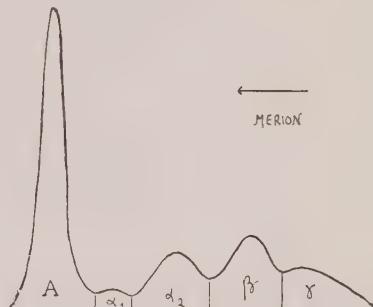


FIG. 3.

électrophorétique est caractérisé par une fraction très importante de globuline β (presque le double de la fraction β de l'homme).

Au cours d'une étude antérieure, nous avions déjà noté ce fait

TABLEAU I.

Espèce	Nbre	Albumines	Globulines				A/Σ
			α_1	α_2	β	γ	
Homme		60,2($\pm 3,9$)	3,3($\pm 0,9$)	7,6($\pm 1,8$)	12,4($\pm 2,3$)	16,5($\pm 2,8$)	1,5
Rattus norvegi- cus	30	55,5($\pm 3,07$)		7,45($\pm 1,34$)	22,95($\pm 3,77$)	14,15($\pm 2,73$)	1,24
Meriones grandis	10	52,66($\pm 1,33$)	5,2($\pm 1,18$)	13,7($\pm 1,07$)	21,47($\pm 2,11$)	10,11($\pm 0,54$)	1,14
Mus musculus	8	60,3		10,06	18,50	11,14	1,5

Valeurs moyennes normales des différentes fractions protéiques de l'homme et de trois espèces de rongeurs. (La valeur moyenne de chaque fraction est accompagnée de l'écart moyen type).

chez deux espèces de Reptiles qui présentaient un taux de globulines β égal à 31,5 p. 100, scindable en deux groupes β_1 et β_2 .

D'autres auteurs (Groulade et Alter) ont montré que le sérum

des chiens normaux possède des globulines β élevées (20 p. 100) dans lesquelles on peut séparer deux groupes β_1 et β_2 .

II. — MODIFICATIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES LORS DE L'IMMUNISATION.

L'étude du sérum de 13 rats immunisés par des injections intrapéritonéales de broyats de foie et de pancréas de cobayes

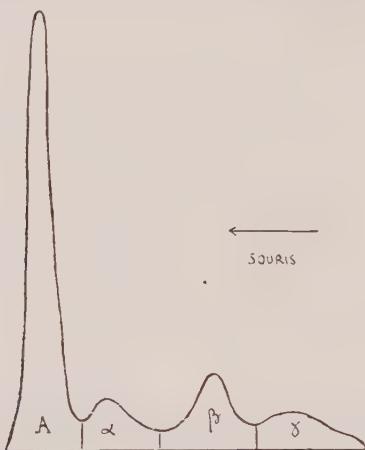


FIG. 4.

et de mérions (deux injections par semaine, durant six à huit semaines) nous a donné les résultats suivants :

	P. 100 ALBUMINES	α	β	γ	A/G
Rat normal	55,5	7,45	22,95	14,15	1,24
Rat immunisé.	50,5	9,3	20,3	19,2	1,02

On note ainsi que l'immunisation par des extraits d'organes n'entraîne pas de modifications électrophorétiques très importantes dans le sérum de ces animaux. Cette immunisation semble cependant produire un léger abaissement de la teneur en albumine, accompagné d'une légère augmentation des globulines γ , ce qui se traduit par un abaissement du rapport A/G.

III. — MODIFICATIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES LORS D'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE EXPÉRIMENTALE.

Pour étudier les modifications protéiniques, nous avons produit des anémies hémolytiques en injectant à un lot de 6 rats un immunsérum anti-globules rouges de rat titrant 1/4 000.

Après un examen électrophorétique préliminaire, les rats ont reçu par voie intraperitoneale du sérum de lapin anti-globules rouges de rat provoquant une chute globulaire intense, le nombre de globules rouges tombe de 7 à 3 000 000 au lendemain de l'injection. La destruction globulaire se poursuit pour tomber à 1 500 000 environ, puis entre le troisième et le treizième jour s'effectue une réparation progressive de l'anémie.

Une seconde injection pratiquée le quatorzième jour provoque à nouveau une chute globulaire plus discrète que la première. Enfin une troisième injection pratiquée le vingt-septième jour est sensiblement sans action.

Les rats ainsi soumis à cette anémie expérimentale ont été suivis au point de vue électrophorétique, les premier, deuxième, sixième, treizième, dix-septième, dix-neuvième, vingt-sixième et vingt-neuvième jours après la première injection.

Les prises de sang pour la numération globulaire ainsi que pour la microélectrophorèse ont été faites à la queue du rat anesthésié à l'éther. Il aurait été intéressant de pouvoir suivre les variations du taux des protéines totales, mais il eut fallu retirer à chaque prélèvement une quantité de sang qui aurait été une cause d'erreur dans l'appréciation du degré de l'anémie provoquée.

Premier cas (rats 3 et 6). — Deux de nos rats n'ont pas survécu à la première injection et sont morts en anémie intense. (L'un est passé de 5 550 000 à 920 000 globules rouges en deux jours.) Dans ces deux cas, nous avons observé une diminution des globulines γ en particulier.

Deuxième cas. — Dans les autres cas, les animaux survivent et l'anémie se répare après la première injection.

On peut observer que la courbe des globulines γ suit assez fidèlement la courbe des globules rouges (fig. 1), se manifestant par une chute des globulines après l'injection du sérum anti-globules rouges. Cette diminution des globulines est d'interprétation délicate. Elle peut être due au fait que l'immun-sérum injecté étant obtenu par injection de globules rouges de rat au lapin, cet immun-sérum obtenu est à la fois actif sur les érythrocytes du rat et sur ses globulines.

Tant que le sérum injecté conserve une activité hémolytique on observe une chute plus ou moins importante et des hématies et des globulines. Dans les cas où l'animal ne réagit plus à l'injection, la montée du taux des globulines va de pair avec la régénération des hématies.

RÉSUMÉ.

L'étude par l'électrophorèse sur papier des protéines sériques de 30 rats normaux, 10 mérions et 8 souris, de 13 rats immu-

nisés et de 6 rats atteints d'anémie hémolytique expérimentale, nous a permis d'établir :

1^o Une approximation du taux des fractions protéiques normales chez ces animaux.

2^o La variation plus ou moins caractéristique de certaines de ces fractions au cours des immunisations et des anémies hémolytiques expérimentales.

BIBLIOGRAPHIE

- L. A. LEWIS, L. H. PAGE et O. GASSER. *Amer. J. Physiol.*, 1950, **161**, 101.
H. F. DEUTSCH et M. B. GOODLOE. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 1.
J. T. EDSALL. *Adv. Protein. Chem.*, 1947, **3**, 383.
W. GRASSMAN, K. HANNIG et M. KNEDEL. *Deutsche Med. Woch.*, 1951,
41, 333.
M. MACHEBOËUF et P. REBEYROTTE. *Rev. Hématol.*, 1952, **7**, 400.
L. DURRUM. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2943.
M. GANZIN, M. MACHEBOËUF et P. REBEYROTTE. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952,
34, 26.
J. FINE, J. GROULADE et A. EYQUEM. *Ces Annales*, 1954, **86**, 378.
P. GROULADE et J. GROULADE. *Ces Annales*, 1953, **85**, 508.

ÉTUDES SUR LES *ESCHERICHIA COLI* ISOLÉS AU COURS DE GASTRO-ENTÉRITES INFANTILES

II. — SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

par YVES CHABBERT, SIMONE LE MINOR, LÉON LE MINOR et PIERRE NICOLLE.
(Avec la collaboration technique de DENISE DRÉAN (*).)

(*Institut Pasteur, Paris.*)

Des études assez nombreuses ont été faites sur la sensibilité de *E. coli* aux divers antibiotiques par Franck, Wilcox et Finland [6], Waisbren et Spink [22], Lutz et coll. [16]. Toutes ont montré que cette espèce rentrait dans la zone d'activité des principaux antibiotiques hormis la pénicilline. Mais des pourcentages très variables de souches résistantes ont par la suite été publiés sur des ensembles de souches provenant d'origines diverses. Il est donc difficile de tirer des études faites sur l'ensemble des *E. coli* des conclusions en ce qui concerne les *E. coli* des groupes 111 : B4, 55 : B5, 26 : B6.

Beaucoup d'auteurs se sont intéressés à la sensibilité des *E. coli* dits « de gastro-entérite du nourrisson ».

Braun [1], Buttiaux et coll. [2], Clément et coll. [4], Ferguson et coll. [5], Giles [7], Gorzynski [8], Gutheil [10], Grönroos [9], Hinton et coll. [11], Kauffmann et coll. [13], Lattes [14], Neter et coll. [18], Karoly et coll. [12], Magnusson et coll. [17], Rogers et coll. [19], Sackreuther [20], Smith et coll. [21]. Les résultats portent sur des séries de souches isolées localement. L'action de la streptomycine s'est montrée très variable, allant de la sensibilité à la résistance totale. Les autres antibiotiques, auréomycine, chloramphénicol et terramycine sont en général actifs, mais certains auteurs ont eu des préférences pour l'un d'entre eux. Il nous a paru intéressant de faire une étude plus générale englobant un nombre important de souches d'origines diverses, titrées par une méthode unique afin de pouvoir faire des comparaisons.

NOMBRE DES SOUCHES ÉTUDIÉES ET ORIGINES. — Nous avons étudié 1 555 souches : 1 033 souches du groupe 111 : B4, 396 du groupe 55 : B5 et 126 du groupe 26 : B6 dont les propriétés bio-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mai 1954.

chimiques et antigéniques ont été étudiées dans un article antérieur [45]. Elles provenaient d'Allemagne (Hambourg), Dr Moser ; Autriche (Vienne), Drs Krepler, Zischka, Roschka ; Canada (Chicoutimi), Dr Butas ; Danemark (Copenhague), Drs Kauffmann et Orskov ; France (Région parisienne et nord de la France) ; Grande-Bretagne (Londres), Drs Cathie et Wright (Aberdeen), Dr Smith (Birmingham), Dr Rogers (Glasgow), Dr Studzinski ; Israël, Dr Olitzki ; Italie (Palerme), Dr d'Alessandro ; Suisse (Zurich), Dr Fey ; U. S. A. (Lansing), Dr Ferguson.

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA SENSIBILITÉ. — La méthode utilisée est une méthode de diffusion en gélose utilisant des disques séchés. La lecture, décrite par l'un de nous [3], se fait par rapport à une souche test sur les courbes de concordance établies par comparaison avec la technique des stries sur gélose. La sensibilité de certaines souches a été contrôlée par plusieurs méthodes différentes.

ETUDE GLOBALE DES SOUCHES DES TROIS GROUPES.

Pour chaque groupe nous avons séparé l'étude des souches inhibées par moins de 60 mcg/ml que nous avons appelées sensibles, de celle des souches qui ne sont pas inhibées par cette concentration, que nous avons appelées souches résistantes.

SOUCHES SENSIBLES.

ACTIVITÉ DES DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES. — Sur la figure 1 on a figuré pour les trois espèces, la répartition de la sensibilité en pourcentages cumulés en fonction des concentrations inhibitrices.

Ces courbes permettent de voir qu'il n'y a pas, sur la base de la concentration inhibitrice, de différences notables d'activité entre les différents antibiotiques. La streptomycine serait plus active sur les souches sensibles, puis viennent l'auréomycine et la terramycine qui ont une activité très voisine. Dans beaucoup de cas les courbes sont confondues. Le chloramphénicol serait légèrement moins actif. Ces différences, qui ne sont valables que pour la technique et les conditions utilisées, sont extrêmement faibles.

Si l'on compare ces courbes aux concentrations humorales moyennes (streptomycine 3-10 mcg/ml, chloramphénicol 6-15 mcg/ml, auréomycine et terramycine 1,5-8 mcg/ml), on voit que la plus grande partie des souches s'inscrit dans la zone de sensibilité. En raison de sa concentration humorale plus élevée, le chloramphénicol reprend même l'avantage.

Sur ces données *in vitro*, on ne peut pas prévoir un avantage

clinique quelconque d'un de ces quatre antibiotiques pour les souches sensibles.

Les trois espèces envisagées n'ont pas la même sensibilité : le groupe 55 : B5 se montre deux à quatre fois plus sensible à tous

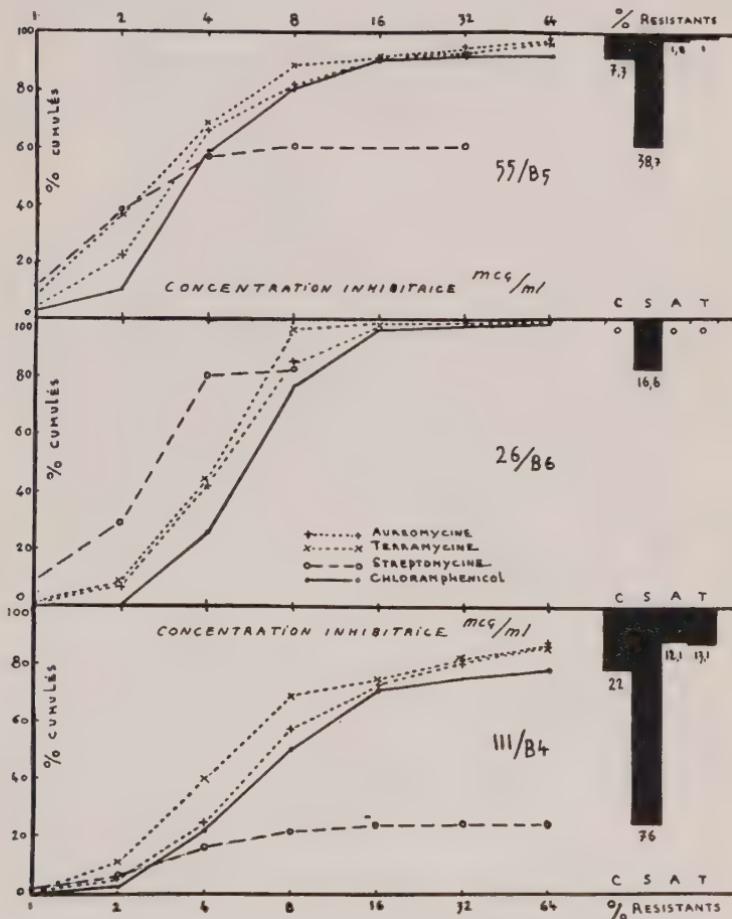


FIG. 1. — Répartition de la sensibilité en pourcentages cumulés en fonction des concentrations inhibitrices.

les antibiotiques que le groupe 111 : B4. Le groupe 26 : B6 occupe une situation intermédiaire.

RÉPARTITION DES SOUCHES SENSIBLES. — Si l'on porte sur un graphique les pourcentages des souches sensibles en fonction du

logarithme des concentrations, on obtient une courbe en cloche. Il est intéressant de savoir si cette répartition est normale. Pour ceci on porte les pourcentages cumulés en fonction des concentrations inhibitrices sur un graphique probabilité/log.

Il est possible d'observer des distributions normales pour les espèces sensibles à un antibiotique, étudiées au moment de l'appa-

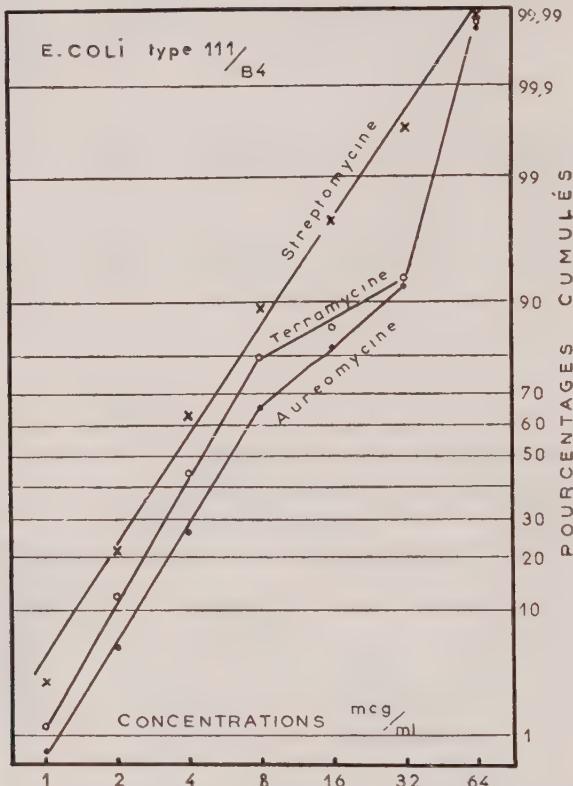


FIG. 2. — Répartition des pourcentages cumulés en fonction des concentrations inhibitrices sur un graphique probabilité/log.

rition de cet antibiotique. Par exemple on retrouve une distribution normale pour le groupe 26 : B6 vis-à-vis de l'auréomycine, antibiotique auquel toutes les souches sont sensibles.

Dans le groupe 111 : B4, on observe deux types de distribution (fig. 2).

Pour la streptomycine, on obtient une relation sensiblement linéaire, donc une distribution normale. La répartition normale des souches restées sensibles n'est pas affectée par la présence

d'un haut pourcentage de souches hautement résistantes formées par mutation en un seul échelon.

Mais pour les autres antibiotiques et surtout pour l'auréomycine et la terramycine, la répartition n'est plus normale, on obtient bien une droite pour les concentrations inférieures à 8 mcg par millimètre pour 70 à 80 p. 100 des souches, mais entre 8 et 32 mcg par millilitre, il y a un changement de pente. En accord avec le type de résistance en échelons multiples observé avec ces antibiotiques, il peut s'agir de résistants des premiers échelons.

SOUCHE RÉSISTANTES.

POURCENTAGES GÉNÉRAUX. — Les pourcentages de souches résistant à plus de 60 mcg/ml varient beaucoup suivant les diverses espèces (tableau 1).

TABLEAU I — Pourcentage des souches résistantes au chloramphénicol, streptomycine, auréomycine, terramycine des groupes 111 : B4, 55 : B5, 26 : B6.

Groupe	Pourcentage des souches résistantes.			
	Chl.	Str.	Aur.	Terr.
26:B6	0	16,6	0	0
55:B5	7,3	38,7	1	1,8
111:B4	22	75	5,6	6,6

La résistance à la streptomycine est de beaucoup la plus élevée. Puis vient le chloramphénicol. Les résistances à l'auréomycine et la terramycine sont très voisines et faibles. Il y a incontestablement beaucoup plus de souches résistantes dans le groupe 111 : B4 que dans le groupe 26 : B6. Le groupe 55 : B5 occupe une situation intermédiaire.

ETUDES SUIVANT L'ORIGINE DES SOUCHES.

Nous avons observé des différences très considérables suivant l'origine des souches.

Nous donnons dans les tableaux II, III, IV, la répartition complète des taux inhibiteurs obtenus suivant les origines.

Dans ces tableaux nous avons mis verticalement les concentrations inhibitrices en mcg/ml pour les quatre antibiotiques étudiés et dans chaque colonne les nombres de souches correspondant à chacune de celles-ci. Le nombre total des souches examinées se trouve en bas de chaque tableau. Il est facile de

voir que la répartition de la sensibilité des souches est profondément différente suivant les origines.

RÉPARTITION EN TYPES DE SENSIBILITÉ. — La sensibilité ou la résistance aux 4 antibiotiques étudiés peuvent se combiner en types divers. Il y a 16 types possibles.

TABLEAU II. — Répartition suivant l'origine des sensibilités des *E. coli* 111 : B4.

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grenade	Bretagne	U.S.A.	Canada	Israël	
0,5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
1	3	2	1			1	4	4			1		
2	40	48	10	1	24	4	3	41	23		7		
4	89	66	7	6	44	7	3	29	19	2	14		
8	98	39	2	1	22	13		22	6		11		
16	30	3			5		3	2					
32	14	1			1		6	4					
64	181				1		25	22	1				
R	456	159	19	8	98	24	7	130	82	3	33		
	C H L O R A M P H E N I C O L												
0,5	0	0	3	0	2	0	1	1	1	1	0	0	
1	2	7	2	13	3	1	9	4		2			
2	23	3	5	5	14	7	2	27	18		8		
4	10				5	3	16	6	2	13			
8	5	1	2		1		8	1		1			
16	2				1		2						
32	1												
64	416	153	2	1	69	7	67	52	1	9			
R	456	159	19	8	98	24	7	130	82	3	33		
	S T R E P T O M Y C I N E												

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grande Bretagne	U.S.A.	Canada	Israël	
0,5	0	0	1	0	2	0	0	0	4	3	0	0
1	20	21	9		12	2	3	17	8		6	
2	70	80	9	4	43	7	3	46	15		19	
4	120	50		4	37	15	1	37	27	2	6	
8	37	6			2			3	6		2	
16	45	1			1			10	8	1		
32	43				1			9	5			
64	121	1						4	10			
R	456	159	19	8	98	24	7	130	82	3	33	
	T E R R A M Y C I N E											
0,5	1	2	0	0	1	0	0	3	0	0	0	
1	9	15	1		3	0		11	4		2	
2	63	51	3	5	12	4	5	31	17		4	
4	116	63	13	3	38	10	2	46	25		21	
8	43	22	2		36	9		23	10	3	4	
16	56	6		6	1			10	11		1	
32	51				1			4	10		1	
64	117				1			2	5			
R	456	159	19	8	98	24	7	130	82	3	33	
	A U R E O M Y C I N F											

Sur 846 souches de *E. coli* 111 : B4 nous donnons (tabl. V) la répartition en pourcentages des divers types rencontrés pour les souches provenant de 8 origines.

Dans 5 cas on rencontre seulement deux types :

- a) le type sensible à tous les antibiotiques ;
- b) le type résistant à la streptomycine seule.

Mais les pourcentages respectifs des deux types sont très variables.

En Italie, le premier type se rencontre presque seul (95 p. 100), tandis qu'en France pour les souches de Lille, c'est le deuxième qui est le type presque unique (96 p. 100).

En Allemagne et en Israël on trouve une répartition identique des deux types. Elle est inversée en Autriche.

Dans deux autres cas on trouve trois types dominants.

En plus des types précédents, en Angleterre, on rencontre un groupe important (17 p. 100) d'un type qui ne se rencontre que là, qui est le type résistant au chloramphénicol seul, et aux

TABLEAU III. — Répartition suivant l'origine des sensibilités des *E. coli* 55 : B5.

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grande Bretagne	U.S.A.	Canada	Israël
0,5	1	4	4			7					
1	3	4			1	4	2	2	3	2	
2	37	20	2	3	19	10	1	42	10	39	8
4	6	7			14	3	22	4	31		
8	7	6			12	2	9	2	3	1	
16							1				
32							1				
64							28	1			
R	54	41	14	3	46	26	1	105	18	77	11
	C H L O R A M P H E N I C O L										

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grande Bretagne	U.S.A.	Canada	Israël
0,5	3	5	6		3	13			4	1	3
1	20	17	7		8	6		29	7	11	2
2	19	12			1	12	4		33	5	33
4	7	6			2	21	2	1	11	4	29
8											
16	3	1			2	1			1	1	1
32	1								5		
64					1				20		1
R	54	41	14	3	45	26	1	105	18	77	11
	T E R R A M Y C I N E										

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grande Bretagne	U.S.A.	Canada	Israël
0,5	1	4	2			9			1	1	
1	12	16	4		1	8		8	1	17	4
2	28	12	8	1	16	4		40	7	53	5
4	6	1			1	18	4	23	6	3	2
8											
16	1	5		1	11	1	1	8	2	4	
32	4	1						10	1		
64	1							11			
R	54	41	14	3	46	26	1	105	18	77	11
	A U R E O M Y C I N E										

U. S. A. un type résistant au chloramphénicol et à la streptomycine.

Enfin à Paris cinq types groupent 98,5 p. 100 des souches. Il y a notamment près de 20 p. 100 de souches résistantes aux quatre antibiotiques.

Ces résultats envisagés sous l'angle de l'activité des antibiotiques indiquent que la résistance à la streptomycine n'est pas liée à celle des autres antibiotiques et qu'il y a résistance croisée pour l'auréomycine et la terramycine, ce qui est classique. Mais d'autre part la résistance croisée entre ces derniers et le chloram-

TABLEAU IV. — Répartition suivant l'origine des sensibilités des *E. coli* 26 : B6.

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grande Bretagne	Bretagne	U.S.A.	Origines diverses
0,5											
1											
2											
4	1	1	9	1	2	5	8			5	
8	4	3	4	4	3	16	13	4	13		
16	3	1			3	5	5			9	
32					1	1					
64						1					
R	8	4	14	5	9	27	28	4	27		
	CHLORAMPHENICOL										

	France A	France B	Italie	Suisse	Autriche	Allemagne	Danemark	Grande Bretagne	Bretagne	U.S.A.	Origines diverses
0,5											
1											
2											
4											
8	1	2	1	2	4	19	14	3	3	3	
16	7	4	11	5	4	5	8	1	23		
32					1					1	
64											
R	8	4	14	5	9	27	28	4	27		
	TERRAMYCINE										

	0,5	1	2	7	1
1	2	1	5	1	3
2	5	3	7	4	6
4	2			1	13
8				2	23
16					
32					
64					
R	8	4	14	5	9
	27				
	STREPTOMYCINE				

	0,5	1	2	7	1
1					
2	3	1		2	18
4	4	3	9	2	15
8	1	5	2		3
16					1
32					1
64					
R	8	4	14	5	9
	27				
	AUREOMYCINE				

TABLEAU V. — Répartition en pourcentages des divers types de sensibilité rencontrés pour les souches de *E. coli* 111 : B4 de huit origines.

Chloramphénicol	Streptomycine	Terramycine	Auréomycine	Italie	France (Lille)	Allemagne	Israël	Autriche	Angle-terre	U.S.A.	France (Paris)
S S S S	95	4			77	73	28	32		30	10
R S S S								17			
S R S S	5	96			23	27	71	50	47	47	
R R S S									17	20	
S R R R											3
R R R R								1	6	19	
Divers							1				1
Nombre de souches	19	124			22	33	96	132	70	324	

phénicol n'est pas aussi complète que les études portant sur l'acquisition de la résistance *in vitro* le feraient prévoir.

Des différences d'activité clinique des antibiotiques sont donc à prévoir dans les divers pays.

Sous l'angle épidémiologique, la fréquence de certains types pour des souches de même origine (deux à trois types sur seize possibles) et les différences suivant l'origine soutiennent l'importance de la contagion.

RAPPORTS ENTRE LA SENSIBILITÉ « IN VITRO » AUX ANTIBIOTIQUES ET LE TYPE BIOCHIMIQUE ET ANTIGÉNIQUE. — En plus des variations sérologiques et biochimiques suivant l'origine, il existe pour les différents groupes des rapports entre la sensibilité *in vitro* aux antibiotiques et le comportement sur gélose à l'acide phényl-propionique.

Groupe 111 : B4. — Ainsi dans le groupe 111 : B4, les souches possédant l'antigène H₂ sont les seules à avoir une réaction phényl-propionique positive. Toutes les souches de ce type isolées en France sont résistantes à la streptomycine. C'est aussi à ce type qu'appartiennent les 111 : B4 résistantes aux quatre antibiotiques. Ceci n'est pas valable pour les autres origines : les 111 : B4 des pays étrangers sont pour la plupart beaucoup plus sensibles que les souches françaises aux antibiotiques. Les 111 : B4 des types II, III, IV, V, VI, VII sont sensibles aux quatre antibiotiques.

Groupe 55 : B5. — Dans le groupe 55 : B5, les seules souches à réaction phényl-propionique positive sont les 55 : B5 : 2 de type biochimique D, qui proviennent toutes de Grande-Bretagne. Alors que les autres types de 55 : B5 sont sensibles aux quatre antibiotiques, les souches du type D sont résistantes à la streptomycine et au chloramphénicol, très peu sensibles à la terramycine et l'auréomycine.

Groupe 26 : B6. — Toutes les souches 26 : B6 que nous avons étudiées avaient une réaction phényl-propionique négative, quel que soit leur type biochimique. Les souches résistantes à la streptomycine proviennent toutes du Danemark. À part cette exception, les 26 : B6 sont sensibles aux quatre antibiotiques.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

La sensibilité aux antibiotiques de 1 555 souches d'*E. coli* de gastro-entérite est étudiée. 1 033 appartiennent au groupe 111 : B4, 396 au groupe 55 : B5 et 126 au groupe 26 : B6. Elles proviennent de France et de divers pays étrangers.

La streptomycine, le chloramphénicol, la terramycine et l'auréomycine ont une activité voisine sur les souches sensibles. Mais dans chaque groupe il existe un pourcentage variable de souches

résistantes. Ce pourcentage est maximum pour la streptomycine (76 p. 100 dans le groupe 111 : B4), minimum pour l'aurotéomycine (12 p. 100 dans le groupe 111 : B4) et intermédiaire pour le chloramphénicol (22 p. 100 dans le groupe 111 : B4).

L'étude de la sensibilité suivant l'origine et la répartition en types de sensibilité met en évidence des différences très importantes d'un pays à l'autre, vraisemblablement en relation avec les épidémies.

Enfin, il existe une liaison entre la résistance des 111 : B4 et 55 : B5 et leur action sur l'acide phényl propionique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. H. BRAUN. *Ergebn. inner. Med. Kinderheilk.*, 1953, **4**, 52.
- [2] R. BUTTIAUX, L. CHRISTIAENS, A. BRETON et G. LEFÈVRE. *Presse Méd.*, 1951, **47**, 1000.
- [3] Y. CHABBERT. *Ann. Biol. Clin.*, 1951, **9**, 544.
- [4] R. CLÉMENT, Y. GERBEAUX, COMBES, HAMELLE, B. MEYER et C. RAMEIX. *Arch. Fr. Pédiatrie*, 1951, **8**, 421.
- [5] W. W. FERGUSON, J. C. JENNINGS et R. Y. GOTTSCHALL. *Am. J. Hyg.*, 1951, **53**, 237.
- [6] P. F. FRANCK, C. WILCOX et M. FINLAND. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **35**, 188.
- [7] C. GILES. *Lancet*, 1948, **2**, 706.
- [8] E. A. GORZYNSKI et E. NETER. *Antib. Chemoth.*, 1953, **3**, 798.
- [9] J. A. GRÖNROOS. *Acta Path. Scand.*, 1951, suppl. 91.
- [10] GUTHIL. *Msch. Kinderheilk.*, 1951, **99**, 225.
- [11] N. A. HINTON, J. E. NELLES et G. B. REED. *Canad. J. Med. Sci.*, 1953, **31**, 431.
- [12] R. KAROLY et U. GYORGY. *Kul. Kis. Orv.*, 1953.
- [13] F. KAUFFMANN et A. DUPONT. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1950, **27**, 552.
- [14] E. LATTEZ et G. COLOMBO. *Giorn. Malatt. Inf. e Parass.*, 1953, **5**, 11.
- [15] S. LE MINOR, L. LE MINOR, P. NICOLLE et R. BUTTIAUX. Ces *Annales*, 1954, **86**, 204.
- [16] A. LUTZ, A. WITZ, A. TROUSSSEL, C. GRAD et A. NALLANO. *Strasbourg Med.*, 1951, **2**, 1.
- [17] J. H. MAGNUSON, G. LAURELL, E. FRISELL et B. WERNER. *Brit. Med. J.*, 1950, **1**, 1398.
- [18] E. NETER, C. R. WEBB, C. N. SHUMWAY et M. R. MURDOCK. *Amer. J. publ. Health*, 1951, **41**, 1490.
- [19] K. B. ROGERS, S. J. KOEGLER et J. GÉRARD. *Brit. Med. J.*, 1949, **2**, 1501.
- [20] SACKREUTHER. *Med. Inaug. Dis. Heidelberg*, 1952.
- [21] J. SMITH et A. N. GALLOWAY. *Arch. Dis. Childr.*, 1953, **28**, 30.
- [22] B. A. WAISBREN et W. W. SPINK. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **74**, 35.

PURIFICATION DE LA TOXINE ET DE L'ANATOXINE STAPHYLOCOCCIQUES ALPHA

par A. TURPIN, E.-H. RELYVELD, J. PILLET et M. RAYNAUD (*)
(avec la collaboration technique de J. RIZA).

(*Service des Anaérobies. Institut Pasteur [Garches]
et Laboratoire du Staphylocoque.*)

Après l'étude de la purification de la toxine tétanique [1], de la toxine diptérique [2], et de la toxine botulinique C [3], il nous a paru intéressant d'étudier la purification de la toxine et de l'anatoxine staphylococciques α .

Divers auteurs ont déjà essayé de purifier et de concentrer la toxine et l'anatoxine staphylococciques α . Holt [4] a utilisé le sulfate d'ammonium. Récemment Tasman et ses collaborateurs [5] ont publié une technique de purification de l'anatoxine staphylococcique par précipitation au sulfate d'ammonium, ultrafiltration et adsorption sur phosphate d'aluminium : ils obtiennent ainsi un excellent antigène vaccinant.

La précipitation par les acides a fait l'objet de plus nombreuses recherches. Burnet et Freeman [6] traitent la toxine par l'acide acétique. Nélis, Bouckaert et Picard [7] ont étudié l'action des acides forts. Boivin [8] purifie l'anatoxine staphylococcique par précipitation à l'acide trichloracétique à pH = 3,5, redissout le précipité en alcali faible, mais note un allongement du temps de flocculation.

Utilisant cette anatoxine, Bocage, Pillet et Mercier [9, 10, 11] constatent que l'antigène ainsi purifié donne des résultats immunologiques très satisfaisants.

En 1948, Wittler et Pillemer [12], par précipitation au méthanol dans des conditions rigoureusement contrôlées de pH, force ionique et température, ont obtenu une toxine staphylococcique titrant 1 200 Lf/mg N et 2 410 DMM/mg N.

L'objet de la présente communication est de rapporter les travaux de purification effectués sur la toxine staphylococcique α de l'Institut Pasteur.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 mai 1954.

TECHNIQUES :

La toxine staphylococcique brute utilisée provenait du Laboratoire du Staphylocoque. Elle a été préparée sur milieu à base de mélange de digestion papaïnique de viande de veau et d'hydrolysat de gélatine.

La digestion papaïnique de viande de veau (milieu R. A. P.) a été mise au point par Ramon, Mercier, Pochon et Amoureaux [13] et adaptée par Mercier et Pillet [14] à la production régulière de la toxine.

L'hydrolysat de gélatine est préparé selon Ramon, Boivin et Richou [15].

Le milieu final, appelé milieu « A » [16] présente la composition suivante :

Digestion papaïnique de viande de veau	500 ml
Hydrolysat de gélatine	20 ml
Gétrate trisodique.	3 g
Phosphate monopotassique	8 g
Glucose	5 g
Chlorure de sodium	9 g
Eau distillée	Q.S.P. 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,4. On répartit sous le volume de 1,300 l dans des ballons Fernbach de 2 l. On stérilise quarante-cinq minutes à 112-115°.

Voici quelques caractéristiques du « milieu A » :

Extrait sec	43,9 g/l
Azote total	3,09 g/l
Azote animé (Sörensen)	0,51 g/l
Azote ammoniacal	0,046 g/l
Azote trichloracétique	0,004 g/l

L'hydrolysat de gélatine a une concentration en azote total de l'ordre de 4,63 g/l, celle du milieu de digestion papaïnique est de 4,7 g/l.

Le milieu estensemencé avec la souche Wood 46. Les ballons Fernbach sont mis à 37-38° sous atmosphère de CO₂ (mélange gazeux de 20 p. 100 d'auhydride carbonique et 80 p. 100 d'oxygène ou d'air) pendant sept jours. Au bout de ce temps, la toxine est filtrée sur disques de cellulose amiantée, puis sur bougie Chamberland ; elle est additionnée ensuite de 4 p. 1 000 de formol et mise à l'étuve dix jours à 39-40° pour être transformée en anatoxine.

La toxine titre en moyenne 15 unités flocculantes (U. F.) au centimètre cube. Son pH varie de 6,9 à 7,2.

La dose minima mortelle a été déterminée par voie intraperitoneale sur souris de 18 à 20 g, en prenant pour les dilutions

les mêmes précautions que pour le dosage de la toxine téta-nique [17, 18, 19]. La durée d'observation des animaux était de quatre jours. On peut noter que lorsque la dose de toxine entraîne la mort, celle-ci survient ordinairement en vingt-quatre heures, rarement après quarante-huit heures.

Le pouvoir floculant (Lf) et le temps de flocculation optimum en minutes (Kf) ont été déterminés par la méthode de Ramon [20].

La dose minima hémolytique (DMH) a été déterminée de la façon suivante : dans une série de tubes à hémolyse, on verse 2 ml de dilution de toxine (de 1/100 à 1/20 000), puis on ajoute 0,1 ml d'une suspension-étalon de globules rouges de lapin. On agite. Après un séjour d'une heure à l'étuve à 37°, puis d'une heure à la température du laboratoire, on lit les résultats. La plus forte dilution provoquant l'hémolyse totale est la dose minima hémolytique.

Les globules rouges de lapin sont obtenus par ponction cardiaque. Le sang est recueilli dans un ballon contenant de l'oxalate de sodium en quantité telle que sa concentration finale soit de 2 p. 1 000. Après 3 lavages successifs à l'eau physiologique, on ramène au volume initial. On fait une suspension au 1/20 qui sera la *suspension-mère* utilisée. Cette suspension est standardisée de la façon suivante : après dilution au 1/20 en eau physiologique (1/400 par rapport à la suspension initiale) la densité optique de l'émulsion lue au photomètre de Klett-Summerson, avec l'écran 540, était de 200 divisions.

Après lyse par l'eau distillée (1 volume de suspension + 19 volumes d'eau distillée), la solution d'hémoglobine obtenue doit avoir une densité optique correspondant à 110 divisions du photomètre de Klett-Summerson (écran 540). Les lectures sont effectuées en tubes de 14 mm de diamètre. Dans le texte, cette suspension sera appelée « suspension-étalon de globules rouges de lapin ».

La dose hémolytique 50 (DH 50) a été déterminée par la technique d'Ipsen [21], mais en complétant le volume à 5 ml avec le tampon isotonique de Jensen [22]. Les lectures sont faites, après centrifugation, au photomètre de Klett-Summerson (écran 540).

La dose-test hémolytique de la toxine (Lh) est la plus petite quantité de toxine qui, mélangée à une unité antitoxique, provoque l'hémolyse totale de 0,1 ml de suspension-étalon de globules rouges de lapin. Elle a été déterminée par la technique de Dolman et Kitching [23] modifiée par Nélis [24].

Le dosage de l'anatoxine staphylococcique se fait par la détermination du *pouvoir de combinaison* (Lh), selon Ramon et Richou [25] et Mercier et Pillet [26, 27].

La détermination de l'azote total a été faite en double essai par la méthode de Kjeldahl.

La force ionique a été calculée après addition de tous les réac-

tifs au système. Les tampons acide acétique-acétate de sodium de force ionique déterminée ont été préparés en utilisant les nomogrammes de Boyd [28]. Les concentrations en ions hydrogène ont été déterminées à l'électrode de verre après avoir réchauffé l'échantillon à 25°. Les centrifugations ont été faites sur appareils ordinaires, à 0°, — 5°, et — 15°. Des bains à température constante ont été utilisés pour maintenir à la température désirée les solutions en cours de fractionnement.

Il n'y a pas de relation constante entre le pouvoir floculant et l'activité létale de la toxine. Une récupération complète des unités de flocculation accompagnée d'une baisse du titre en doses minima mortelles indique une dénaturation de la toxine et la présence de toxoïde.

TECHNIQUE DE PURIFICATION.

La toxine brute additionnée de chlorure de sodium à la concentration de 250 g par litre et refroidie à — 15° dans des thermos-tats, est précipitée par l'acide métaphosphorique selon Raynaud et Turpin [29, 30] : on ajoute une solution *préparée extempora-nément* et refroidie à 0° d'hexamétaphosphate de sodium (marque Darrasse) de façon à réaliser une concentration finale de 1 p. 100, puis de l'acide sulfurique normal pour obtenir un pH = 3,5. Au bout de trente minutes, un précipité fin et peu abondant apparaît. On centrifuge à basse température (— 15°). Le précipité obtenu M est de couleur brun clair. On le redissout en acétate de sodium 0,150 M de pH = 6,9, dans un très faible volume de ce tampon, le 1/10 ou le 1/30 du volume initial. C'est la solution S₁.

La deuxième précipitation a été effectuée par relargage au phosphate (mélange équimoléculaire de phosphate monopotassique et dipotassique 3,5 M, pH = 6,5 d'après Butler et Montgomery [31] et Derrien [32, 33]). Le précipité obtenu avec 50 p. 100 de solution concentrée de phosphate, non toxique et contenant des substances retardant la flocculation, est éliminé. La fraction précipitant entre 50 et 80 p. 100 de solution concentrée de phosphate (P₁) contient la toxine en totalité. Ces deux précipitations se font à 0° en laissant les précipités se former pendant vingt-quatre heures. Le précipité P₁ recueilli sur filtre est dissous en acétate de sodium 0,150 M, pH = 6,9. C'est la solution S₁.

La troisième précipitation a été effectuée d'après Wittler et Pillemer [12] dans les conditions suivantes : pH = 4,0 ; force ionique : 0,10 ; température : — 5° ; en présence de 15 p. 100 de méthanol purifié selon Winkler [34]. Après dix-huit heures à — 5°, le précipité P₂ est recueilli et redissous dans un volume d'acétate de sodium 0,150 M, pH = 6,9 égal au volume employé pour la redissolution de P₁. C'est la solution S₂.

La quatrième précipitation se fait à très basse température

(—30°) en traitant la solution S_2 par un égal volume d'éthylène-glycol mono-éthyl-éther (cellosolve) déjà utilisée par Martin et Porter [35] et Porter [36] pour les chromatographies de partage. Après un contact de six heures, le précipité P_3 est recueilli et redissous en acétate de sodium 0,150 M, pH = 6,9. C'est la solution S_3 .

Le procédé est le même pour le fractionnement de l'anatoxine. Les résultats obtenus pour la toxine et l'anatoxine sont résumés dans les tableaux I et II.

TABLEAU I.

	UF/ml	KF min.	N mg/ml	Lh/ml	UF/mg N	Lh/mg N	Rendement en UF (%)	Rendement en Lh (%)	Facteur de purif.
Anatoxine brute	10	25	2,91	5	3,4	1,7			
S_M	500	35	1,79	120	279	67	100	50	
S_1	450	40	0,40	120	1125	300	90	100	
S_2	300	60	0,16	80	1875	500	66	66	
S_3	300	60	0,14	80	2140	570	100	100	629

TABLEAU II.

	UF/ml	KF min.	N mg/ml	Lh/ml	DMM/ml	DMH/ml	UF/mg N	Lh/mg N	DMM/mg N	DMH/mg N	Rendement*	UF (%)	Lh (%)	DMM; DMH (%)
Toxine brute	15	45	2,73	4	12,5	1000	5,4	1,4	4,5	366				
S_M	300	15	0,294	50	250	20000	1020	170	850	62000	100	62	100	100
S_1	300	10	0,130	70	500	40000	2300	538	3840	307692	60	64	120	122
S_2	200	10	0,066	50	500	30000	3030	757	7575	454945	66	71	100	75
S_3	150	10	0,045	40	500	30000	3550	888	11100	660000	75	80	100	100

Les différentes fractions S_M , S_2 , S_3 , ont été essayées par la méthode de précipitation spécifique en gel de Oudin [37, 38]. La technique employée, dérivée de celle de Oakley [39], est analogue à celle que nous avons employée dans le cas de la toxine diphtérique [2].

Le sérum utilisé dans la couche inférieure est un sérum de cheval (n° 503), titrant 400 UF/ml. Il est dilué de façon à ce que la concentration soit de 30 UF/ml dans la couche inférieure gélifiée. Les diverses fractions sont ajoutées à l'état liquide, sans gélification, à deux concentrations : 30 UF/ml et 60 UF/ml, dans la zone supérieure.

Les photographies reproduites dans la fig. 1 ont été prises après dix-huit jours de séjour des tubes à la chambre-étuve à 35°.

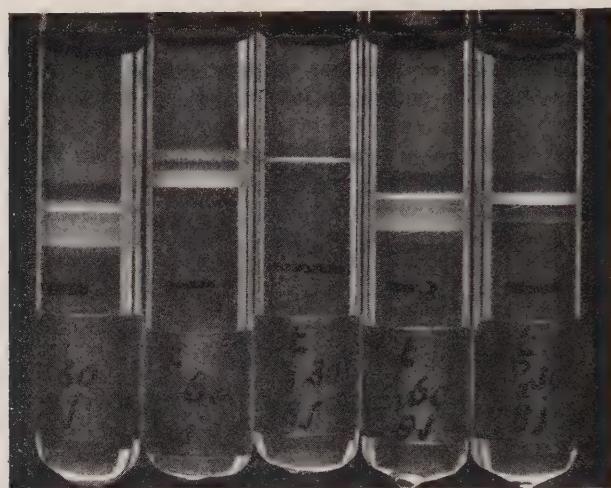


FIG. 1. — La couche inférieure contient le sérum antistaphylococcique de cheval à la concentration finale de 30 UF/ml; la fraction M a été ajoutée à concentration équivalente (30 UF/ml) (tube 1); la fraction P_3 a été ajoutée à la concentration de 60 UF/ml (tube 2) et 30 UF/ml (tube 3). La fraction P_2 a été ajoutée à la concentration de 60 UF/ml (tube 4) et 30 UF/ml (tube 5).

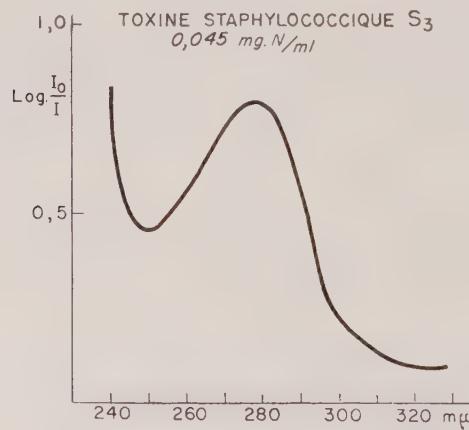


FIG. 2.

La courbe d'absorption dans l'U. V. du produit S_3 a été déterminée au spectrophotomètre Beckman (fig. 2).

DISCUSSION.

On peut constater par l'examen du tableau II que les rapports des différentes propriétés de la toxine staphylococcique varient de façon appréciable au cours du fractionnement. Ainsi, entre la toxine brute et la fraction S_3 , alors que l'activité floculante et l'activité毒ique sont à peu près conservées, le pouvoir de combinaison mesuré en unités Lh, baisse de 50 p. 100 environ. Les stades ultérieurs de la purification amènent des modifications importantes dans les rapports des diverses activités, comme le montre le tableau III.

TABLEAU III.

	UF/Lh	DMM/Lh	DMH/Lh	DMM/UF	DMH/UF
Toxine brute	3,75	3,12	250	0,83	66
Toxine purifiée (S_3)	3,75	12,5	750	3,33	200

Il en résulte que le coefficient de purification : Activité (UF, Lh, DMM, DMH) par mg N de la toxine purifiée/Activité par mg N (exprimée dans les mêmes unités) de la toxine brute, varie suivant l'unité considérée (tableau IV).

TABLEAU IV.

	UF	Lh	DMM	DMH
Coefficient de purification	650	630	2460	1800

Il semble que la purification par le procédé décrit s'accompagne d'une réactivation de la toxine. Cette réactivation correspondrait à une multiplication par trois de l'activité toxicité pour un même pouvoir de combinaison. On n'observe pas de phénomène analogue avec la technique de Wittler et Pillemer [12]. Le coefficient de purification est pour le produit le plus pur qu'ils aient obtenu de 200 (UF) ou 144 (DMM).

Par ailleurs, il apparaît que le système adopté pour définir l'unité de flocculation de toxine staphylococcique alpha n'est pas adéquat. Avec le sérum que nous avons utilisé, il existe un décalage entre le titre exprimé en UF et le titre exprimé en unités Lh. Ce décalage varie suivant la fraction considérée.

CONCLUSION ET RÉSUMÉ.

La toxine staphylococcique alpha a été purifiée par une technique comportant les différents stades suivants :

1^o Précipitation à — 15° par l'acide métaphosphorique à pH = 3,5 de la toxine brute ;

2^o Fractionnement par les solutions concentrées de phosphates 3,5 M de pH = 6,9 ;

3^o Fractionnement par le méthanol suivant Pillemeyer (MeOH 15 p. 100, force ionique 0,10, température — 5°, pH = 4,0) ;

4^o Fractionnement par l'éthyl-cellulosate (éthylène-glycol-mono-éthyl-éther) à — 20°.

Le produit obtenu, S₃, présente une activité élevée : 3 550 UF/mg N, 888 Lh/mg N, 11 100 DMM/mg N, 660 000 DMH/mg N. Il contient encore cependant au moins deux constituants, d'après l'examen par la méthode de diffusion en gel, méthode qui apparaît très sensible pour l'appréciation de la pureté d'une protéine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. TURPIN, M. RAYNAUD et M. ROUYER. Ces *Annales*, 1952, **82**, 299.
- [2] E. H. RELYVELD, A. TURPIN, A. LAFFAILE, C. PARIS et M. RAYNAUD. Ces *Annales*, 1954 (sous presse).
- [3] M. RAYNAUD, A. R. PRÉVOT, J. BRYGOO, A. TURPIN et E. H. RELYVELD. Ces *Annales* (en préparation).
- [4] L. B. HOLT. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 318.
- [5] A. TASMAN, A. C. BRANDWIJK, A. MARSEILLE, J. D. VAN RAMSHORT et J. VAN DER SLOT. *Antonie van Leeuwenhoek* 1952, **18**, 336.
- [6] F. M. BURNET et M. FREEMAN. *J. Path. Bact.*, 1932, **35**, 477.
- [7] P. NÉLIS, J.-J. BOUCKAERT et E. PICARD. Ces *Annales*, 1934, **52**, 597.
- [8] A. BOIVIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 284.
- [9] A. BOCAGE, P. MERCIER et J. PILLET. *Ann. Dermat. Syphil.*, 1946, **9**, 497.
- [10] A. BOCAGE, P. MERCIER et J. PILLET. *Presse Méd.*, 25 janvier 1947, 60.
- [11] A. BOCAGE, P. MERCIER et J. PILLET. Ces *Annales*, 1947, **73**, 77.
- [12] R. G. WITTLER et L. PILLEMER. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 23.
- [13] G. RAMON, P. MERCIER, J. POCHON et G. AMOUREUX. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 329.
- [14] P. MERCIER et J. PILLET. Ces *Annales*, 1947, **73**, 809.
- [15] G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU. *C. R. Acad. Sci.*, 1938, **207**, 466.
- [16] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. Ces *Annales*, 1951, **81**, 224.

- [17] L. PILLEMER. *J. Immunol.*, 1946, **53**, 277.
- [18] S. MÜTERMILCH, M. BELIN et E. SALOMON. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 1005.
- [19] S. MÜTERMILCH, M. BELIN et E. SALOMON. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1245.
- [20] G. RAMON, P. NÉLIS et H. BONNET. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 787.
- [21] J. IPSEN. *Contribution to the theory of biological standardization*, Copenhague, 1941, 48.
- [22] CL. JENSEN. *Acta Path. Scand.*, Suppl. **14**, Copenhague, 1933.
- [23] C. E. DOLMAN et J. S. KITCHING. *J. Path. Bact.*, 1935, **41**, 137.
- [24] P. NÉLIS. *Rev. Immunol.*, 1935, **4**, 152.
- [25] G. RAMON et R. RICHOU. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 517.
- [26] P. MERCIER et J. PILLET. *Ces Annales*, 1949, **76**, 183.
- [27] P. MERCIER et J. PILLET. *Bull. O. M. S.*, 1949, **2**, 49.
- [28] W. C. BOYD. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1035.
- [29] M. RAYNAUD, A. TURPIN et L. NICOL. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2122.
- [30] A. TURPIN, M. RAYNAUD et E. H. RELYVELD. *Ces Annales*, 1954 (sous presse).
- [31] A. M. BUTLER et H. MONTGOMERY. *J. biol. Chem.*, 1933, **99**, 173.
- [32] Y. DERRIEN. *Doct. Sc. Phys.*, Marseille, 1946, 168 (manuscrit).
- [33] Y. DERRIEN. *Särtryck ur Svensk Kemisk Tidskrift*, 1947, **59**, 139.
- [34] WINKLER. *Berichte*, 1905, **38**, 3612.
- [35] A. J. P. MARTIN et R. R. PORTER. *J. Bioch.*, 1951, **49**, 215.
- [36] R. R. PORTER. *J. Bioch.*, 1953, **53**, 320.
- [37] J. OUDIN. *Ces Annales*, 1948, **75**, 30.
- [38] J. OUDIN. *Methods in Medical Research*, Chicago, 1952, vol. 5, 335.
- [39] C. L. OAKLEY et A. J. FULTHORPE. *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.

INFLUENCE DE LA CORTISONE SUR LES TENEURS DU MUSCLE ET DU FOIE EN COMBINAISONS PHOSPHORÉES

par FRANÇOIS GROS et SERGE RONFILS (*).

(*Institut Pasteur.*)

Diverses observations physiologiques ont montré que les extraits du cortex surrénal manifestent un effet régulateur sur le métabolisme du glycogène. Ces faits sont connus depuis longtemps et l'on a réussi à démontrer *in vitro* [1] que l'utilisation du glycogène par des coupes de foie est ralentie en présence d'extraits totaux du cortex surrénalien. Néanmoins le mécanisme de cette action demeure encore obscur.

On peut se demander, en effet, si les stéroïdes freinent le catabolisme du glycogène (inhibition de la glycogénolyse) ou s'ils en activent la resynthèse.

Tandis que l'inhibition de la glycogénolyse a retenu un moment la faveur de Seckel [1] et de Long [2], Chiu et Needham [3] apportaient plus récemment des arguments en faveur d'une activation de la resynthèse du glycogène. C'est ainsi que l'anaérobiose abolit totalement l'inhibition exercée par les extraits corticosurrénaux sur l'utilisation du glycogène *in vitro*, fait difficilement compatible avec le freinage de la glycogénolyse. Ces conclusions ont d'ailleurs été étendues [4] à des stéroïdes purs, parmi lesquels la cortisone, ou 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone et la désoxy-corticostérone (DOCA).

Pour interpréter l'activation d'une resynthèse du glycogène, Chiu et Needham émettent deux hypothèses :

a) Les extraits corticosurrénaux activeraient le catabolisme des aminoacides et il s'effectuerait une néoglycogenèse aux dépens des dérivés cétoniques résultants, selon un mécanisme déjà signalé par Ville et Hastings [5].

b) Les corticostéroïdes activeraient directement les phosphorylations oxydatives des oses.

La première hypothèse trouve appui dans une série d'observations physiologiques et biochimiques, montrant qu'après injection

(*) Manuscrit reçu le 20 mars 1954.

d'extraits surrénaux, l'accumulation de glycogène va presque toujours de pair avec une diminution des protéines tissulaires ; elle repose aussi sur le fait que les stéroïdes accroissent considérablement le catabolisme oxydatif de certains amino-acides (Umbreit [6, 7, 8], Russel *et al.* [9]).

La seconde interprétation fut émise par Verzar, il y a une dizaine d'années déjà [10, 11]. On ne possède néanmoins aucune preuve de l'influence directe des oxystéroïdes sur des processus de phosphorylation. Bien plus, Chiu et Needham [3] n'ont pas réussi à mettre en évidence une influence d'extraits cortico-surrénaux sur le métabolisme de l'A. T. P. dans des coupes de foie.

Plus récemment encore, Umbreit et Tonhazy [12] puis Conway *et al.* [13] ne constatent aucun changement dans les teneurs des muscles de rats en ATP, phosphates et phosphocréatine, après des traitements assez prolongés par la cortisone.

Sans prétendre aucunement apporter une solution définitive à ce problème, nous décrirons ici quelques résultats d'études analytiques préliminaires, qui révèlent chez le lapin soumis à des injections de cortisone, des variations importantes dans la répartition du phosphore musculaire au sein de ses diverses combinaisons.

Ces résultats fragmentaires ne nous semblent intéressants que dans la mesure où ils susciteront des études enzymatiques sur le métabolisme phosphoglucidique chez des animaux soumis à l'influence des oxystéroïdes.

**

Les stéroïdes utilisés ici sont la cortisone (11-déhydro-17-hydroxycorticostérone) et le composé F de Kendall ou hydrocortisone (17-hydroxycorticostérone) que nous devons à la générosité du professeur M. Tischler (Merck Institute for Therapeutic Research).

Des lapins (poids moyen 2,500 kg) sont soumis quotidiennement à des injections de cortisone ou d'hydrocortisone, correspondant à 20 mg de stéroïde (voie intramusculaire). En général, vingt-quatre heures après la quatrième injection, les animaux sont sacrifiés, disséqués rapidement dans une enceinte à — 15° C. Les muscles (provenant de trois lapins différents d'une même série) sont pesés très rapidement, puis plongés aussitôt dans une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100, refroidie à 0° C. Leur broyage est effectué dans cette solution au sein d'un « Waring Blender » et dure soixante secondes. La suspension homogène est centrifugée pendant cinq minutes (6 000 tours/minute), le liquide surnageant soigneusement recueilli, puis le résidu extrait une seconde fois par une solution d'acide trichloracétique à 1 p. 100.

Les extraits sont réunis, neutralisés rapidement par la soude concentrée en présence de phénolphtaléine (début de virage au rose de la solution en présence de phénolphtaléine à 10 p. 100, à raison de 1/300 du volume total).

Le résidu musculaire est lavé par une solution diluée refroidie d'acide trichloracétique (à 0,1 p. 100) puis soumis à une hydrolyse alcaline selon Good, Kramer et Somogyi [14] pour en extraire le glycogène. Celui-ci, après précipitation par l'éthanol et hydrolyse, est dosé selon Hagedorn et Jensen [15].

Les fractionnements et les dosages de composés phosphorés du muscle sont effectués d'après les indications de Le Page et Umbreit [16].

Pour l'extraction des composés phosphorés du foie, nous avons adopté un mode opératoire quelque peu différent.

L'organe, après dissection, était broyé pendant trente secondes au sein d'eau distillée refroidie au voisinage de 0° C, et l'on opérait les fractionnements sur des portions aliquotes de l'homogénat, dont les teneurs en azote total et en matières sèches étaient déterminées séparément. Pour extraire les composés phosphorés, un volume déterminé de l'homogénat était dilué immédiatement par un volume égal d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100, refroidie à 0° C. Puis l'on procédait comme pour le muscle. Précisons que le glycogène est dosé ici à la fois dans le résidu solide et dans l'extrait acide, puisque une partie du glycogène hépatique passe en solution dans ces conditions.

En outre, toutes les déterminations de composés phosphorés acido-solubles étaient réalisées après élimination du glycogène par l'éthanol [16]. Sans cette précaution, en effet, la plupart des mesures sont entachées d'erreurs du fait d'un entraînement des composés phosphoglucidiques par le glycogène.

Nous avons également effectué certains dosages d'acides pentose- et désoxypentosenucléiques dans le foie après extraction selon Schneider [17], dosages selon Albaum et Umbreit [18] et selon Dische [19].

RÉSULTATS.

A. MUSCLE. — Après quatre injections, sous l'influence de la cortisone, on perçoit des modifications importantes dans les teneurs en phosphates minéraux et en certaines combinaisons phosphorées. Les variations peuvent se résumer ainsi (tableau I) [résultats rapportés pour 100 g de tissu frais] :

Baisse de teneur en orthophosphates (30 à 40 p. 100).

Augmentation considérable de teneur en phosphocréatine, mesurée par le dosage du phosphate labile à 18° C en vingt minutes (milieu sulfurique 1,33 N) (de l'ordre de 120 p. 100).

Augmentation de teneur en glucose 1-phosphate (environ 60 p. 100).

TABLEAU I. — Influence de la cortisone sur les teneurs du muscle en combinaisons phosphatées.

SUBSTANCES DOSÉES	TÉMOINS	ANIMAUX ayant été soumis à 4 injections de cortisone (20 mg) toutes les 24 heures
Phosphates minéraux (mg P/g)	0,30	0,21
Phosphocréatine (mg P/g)	0,32	0,62
A. T. P.		
a) mg de P (libérable après 7 min. d'hydrolyse) par g	0,225	0,131
b) mg de pentoses/g	0,50	0,34
Glycogène en mg de glycogène anhydre/g . .	1,13	2,03
Glucose 1-phosphate en mg de phosphore (libérable après 7 min. d'hydrolyse) par g	0,028	0,056
Fructose 1-6 phosphate en mg de fructose/g . .	0,014	0,016
Fructose 6-phosphate en mg de fructose/g . .	0,156	0,180
Glucose 6-phosphate en mg de glucose équivalent au pouvoir réducteur de la fraction des composés barytiques solubles sans hydrolyse (corrigé du pouvoir réducteur du fructose 6-phosphate) par gramme	0,600	0,712
Phosphopyruvate mg/g	1,0	1,1

Augmentation importante, elle aussi, de la teneur en glycogène (60 à 70 p. 100).

Baisse de teneur en ATP (évalué par la mesure du phosphore hydrolysable en sept minutes, et du ribose de la portion des « composés barytiques insolubles ») [30 à 40 p. 100].

Les autres combinaisons phosphoglucidiques : fructose-6-phosphate, glucose-6-phosphate et acide phosphopyruvique ne varient au contraire que dans de faibles proportions.

Des résultats présentant une constance satisfaisante ont été obtenus sur trois séries d'expériences similaires, chacune étant réalisée sur des mélanges de muscles provenant de trois animaux identiquement traités.

Pour examiner l'influence de la durée du traitement sur les variations qui viennent d'être décrites, nous avons réalisé quelques essais en prolongeant les injections pendant huit jours.

Le tableau II résume les variations quantitatives observées (exprimées en pourcentage).

Une conclusion remarquable s'impose : toutes les modifications vont en diminuant d'intensité quand on prolonge l'action de la

cortisone, ce qui indique assez manifestement l'existence d'une compensation physiologique vis-à-vis du trouble observé dans le métabolisme phosphoglucidique.

TABLEAU II. — **Influence de la durée du traitement sur les modifications exercées par la cortisone dans la composition chimique du muscle.**

SUBSTANCES DOSÉES	VARIATIONS PERCUES après 4 jours de traitement par la cortisone (moyennes de 3 expériences)	VARIATIONS PERCUES après 8 jours de traitement par la cortisone (moyennes de 2 expériences)
Phosphates minéraux . . .	— 35 p. 100	— 9 p. 100
Phosphocréatine	+ 140 p. 100	+ 43 p. 100
A.T.P.	— 30 p. 100	— 22 p. 100
Glycogène.	+ 60 p. 100	+ 14 p. 100

De tels faits s'observent régulièrement sous l'influence de la cortisone dont les activités biochimiques chez l'animal intact apparaissent souvent plus marquées au début du traitement [20, 7].

B. TISSU HÉPATIQUE. — Nous avons signalé récemment [21] que sous l'influence de la cortisone, le foie était le siège d'une diminution marquée de teneur en acide désoxypentosenucléique (DNA), exprimée par rapport à l'azote du tissu (diminution de 40 p. 100 environ après deux injections de 20 mg).

Ces résultats ont été confirmés peu de temps après [22] par Lowe, Williams et Thomas, qui ont observé en outre des modifications dans les propriétés cytochimiques de la cellule hépatique, qui augmente de volume sous l'influence de l'hormone, de telle sorte que le rapport $\frac{\text{RNA}}{\text{DNA}}$ s'accroît considérablement.

Nous apporterons aujourd'hui de nouvelles données relatives à l'influence de la cortisone et du composé F sur les teneurs en composés phosphorés de la chaîne glycolytique, ainsi qu'en glycogène et en phosphates minéraux (tableau III).

On voit, tout d'abord, que les effets biochimiques de la 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone et de la 17-hydroxycorticostérone sont très voisins, du moins en ce qui concerne les modifications de teneurs en glycogène et acide désoxypentosenucléique, et l'absence d'influence sur les teneurs en acides pentosenucléiques et en orthophosphates.

A la différence du muscle, le foie ne semble pas être le siège de modifications dans les teneurs en ions phosphoriques et en ATP sous l'influence des stéroïdes.

Comme dans le muscle, par contre, le glycogène s'accroît considérablement, et les composés phosphoglucidiques ne subissent que d'assez faibles variations.

TABLEAU III. — Composition du foie en combinaisons phosphorées et azotées après traitement par la cortisone ou le composé F.

SUBSTANCES DOSÉES	TÉMOINS	CORTISONNE après 4 jours de traitement 20 mg par jour	HYDROCORTISONE après 4 jours de traitement 20 mg par jour
Azote p. 100 du poids sec	8,96	9,1	8,0
Azote acidosoluble p. 100 du poids sec	0,85	0,76	0,65
Pentoses nucléiques (en µg/mg d'azote)	8,0	7,2	8,2
Acide désoxypentosénucleique en mg p. 100 d'azote	14,1	9,0	8,2
Phosphates minéraux en µg/mg d'azote	5,0	4,2	4,4
A.T.P. en µg ribose/mg d'azote	7,1	8,0	9,0
Fructose 1-6-diphosphate en µg de fructose/mg de fructose/mg d'azote	3,3	3,5	4,2
Fructose 6-phosphate en µg de fructose/mg d'azote	16,8	21,0	15,0
Glucose 6-phosphate en mg de glucose équivalent au pouvoir réducteur de la fraction dite « Barytique soluble » avant hydrolyse	0,100	0,125	0,105
Acide phosphoglycérique en µg/mg d'azote	0,012	0,006	0,011
Pentoses de la fraction « Barytique soluble » en µg/mg d'azote	7,5	8,1	6,2
Glycogène en mg de glucose/mg d'azote	0,125	0,280	0,250

Nous n'avons pas dosé malheureusement la phosphocréatine, ni le glucose-1-phosphate, mais ces résultats préliminaires montrent des différences de comportement déjà importantes entre le muscle et le foie vis-à-vis de la cortisone.

DISCUSSION.

Les modifications chimiques produites dans les tissus musculaire et hépatique sous l'influence de la cortisone peuvent donner lieu à des interprétations fort différentes.

Il nous semble nécessaire avant d'envisager ces hypothèses de rappeler les diverses données antérieures relatives à l'influence des hormones corticoïdes sur le métabolisme glucidique.

Signalons tout d'abord que l'accumulation de glycogène dans la cellule musculaire sous l'influence de la cortisone, n'apparaît pas à première vue comme un phénomène uniforme.

Ainsi ni Albaum [42] ni Conway [43] n'observent de changements importants dans les teneurs en glycogène et en esters phos-

phoriques dans le muscle du diaphragme de rat après administration de cortisone. Ces résultats, qui sont en contradiction apparente avec nos propres observations, peuvent trouver une explication dans la conclusion d'une étude récente due à Léonard [23] : chez le rat normal, soumis à des injections répétées de cortisone, seul le « rectus femoris » (muscle utilisé dans le présent travail) accuse une augmentation de teneur en glycogène ; les autres muscles au contraire ne présentent pratiquement pas de modifications à cet égard. D'ailleurs, en opérant sur le « rectus femoris » du lapin, Kerpolla [24] constate également une élévation importante de teneur en glycogène après injection d'hormone.

Ce point ayant été discuté il est intéressant de souligner à présent la concordance des diverses données de la littérature sur l'effet freinateur exercé par les hormones corticoïdes dans la glycolyse de la cellule musculaire.

Ainsi Conway et Hingerty [13] constatent une diminution des teneurs en glucose-6-phosphate et en fructose-6-phosphate, en même temps qu'un accroissement des teneurs en phosphocréatine et en A. T. P. dans le muscle du rat, après surrénalectomie.

Ces effets seraient imputables à une utilisation accrue d'esters phosphoriques résultant d'une activation générale des activités glycolytiques, après ablation des surrénales. On sait d'ailleurs que la surrénalectomie provoque aussi une diminution des teneurs en glycogène du muscle (Mentha *et al.* [25]), ainsi qu'une activation dans la capacité de consommer le glucose (Ingle et Nezamis [26]).

Tous ces faits laissent supposer qu'enversement certaines hormones du cortex surrénal doivent inhiber à un degré plus ou moins grand les processus de la glycolyse.

De nombreuses données expérimentales permettent de soutenir plus directement encore ce point de vue.

Par exemple, si l'on administre de la cortisone ou de la DOCA aux animaux privés de surrénales, les teneurs en glycogène sont restaurées à leurs valeurs normales [27, 28, 29].

Il résulte d'ailleurs d'études réalisées *in vitro* que les cortico-stéroïdes diminuent la formation du glycogène dans le diaphragme du rat mis en présence de glucose (Leupin et Verzar [30], Bartlett et Mac Kay [31], Bozonie *et al.* [32]) en même temps qu'ils ralentissent la consommation du glucose.

Récemment enfin, Kit et Baron [33] avec un matériel, il est vrai, différent (cellules lymphatiques de l'appendice de lapin) constatent aussi une inhibition de la glycolyse anaérobie par le composé F.

Si l'intervention de la cortisone dans les processus de la glycolyse apparaît donc comme un fait assez bien établi, il reste à préciser le mode d'action de cette hormone sous l'angle biochimique.

On doit à Colowick, Cori et Slein [34] puis à Krahlf et Cori [35]

l'observation que les extraits du cortex surrénal exercent un effet inhibiteur *in vitro* sur l'activité hexokinase des muscles de rats diabétiques.

Plus récemment Kerpolla [24] met en évidence les effets inhibiteurs considérables de la cortisone sur l'activité phosphorylasique des muscles de la patte du lapin. Ainsi chez des animaux soumis à sept injections quotidiennes de 20 mg du stéroïde, l'activité phosphorylasique des muscles n'est plus que le 1/5 environ d'une activité normale.

Il semble donc plausible que la cortisone puisse inhiber l'utilisation du glycogène au cours de son clivage phosphorolytique (ou, suivant les conditions, inhiber sa resynthèse).

Cette interprétation est peut-être valable également pour rendre compte de la surcharge en glycogène musculaire que nous décrivons aujourd'hui.

La diminution de teneur en ATP qui se manifeste dans nos expériences serait une conséquence indirecte de l'inhibition de la glycogénolyse, puisque la resynthèse de l'ATP est liée en partie avec le cycle glycolytique.

Les accroissements de teneurs que nous signalons pour le glucose 1-phosphate et la phosphocréatine, ainsi que la diminution de teneurs en phosphates minéraux s'expliquent moins aisément avec ce schéma. Ils donnent à penser que la cortisone réactiverait ou activerait peut-être plusieurs systèmes enzymatiques de la glycolyse à moins qu'elle n'influe sur leur biosynthèse.

Envisageons à présent le cas de la cellule hépatique : on est tenté d'invoquer ici un mode d'action voisin de celui envisagé dans le cas du muscle, à savoir : un freinage de la glycogénolyse, puisque l'activité phosphorylasique du foie s'abaisse de façon très importante au cours d'un traitement prolongé par la cortisone [24] et puisque, après surrénalectomie, on observe une baisse de teneur en glycogène [25], baisse généralement compensée après administration d'hormone [28]. Il n'est pas impossible cependant, qu'interviennent également d'autres modifications métaboliques.

Rappelons en effet que selon Chiu et Needham [3] la cortisone *in vitro* n'inhibe pas la glycolyse anaérobie dans les coupes de foie.

Nous-mêmes n'observons (en dehors d'une accumulation massive de glycogène) que des changements relativement faibles dans les teneurs en combinaisons phosphorées, en phosphates et en ATP dans la cellule hépatique, chez le lapin, après traitement par la cortisone.

Il faudrait admettre ici que la cortisone inhibe sélectivement la phosphorolyse du glycogène et qu'une compensation, ou une déviation métabolique dans la glycolyse, assure néanmoins le maintien

d'un taux normal pour les diverses combinaisons phosphoglucidiques du tissu hépatique.

Cette éventualité est possible mais il semble également utile de faire appel aux conceptions anciennes de Long [2] d'après qui la cortisone favoriserait la conversion des protides en glycogène. Divers travaux récents apportent d'ailleurs des arguments à cette hypothèse en montrant que les hormones du type oxystéroïde provoquent une augmentation du catabolisme des aminoacides (Russel et Wilhelmi [9], White *et al.* [36], Cagan *et al.* [37], Umbreit et Tonhazy [7]).

L'hormone activerait donc la néoglycogenèse aux dépens d'amino-acides glucoformateurs. (Il n'est pas impossible que les lipides interviennent également comme générateurs indirects de glycogène).

En conclusion, la surcharge en glycogène qui se manifeste dans le muscle de l'animal normal, après injections répétées de cortisone, pourrait relever d'une inhibition directe d'un stade de la glycolyse (et probablement de la glycogénolyse) ; l'augmentation similaire, et plus considérable encore, du glycogène hépatique qui s'observe dans les mêmes conditions aurait probablement pour cause, à côté de cette inhibition, d'autres mécanismes physiologiques plus complexes, tels qu'une activation de la conversion des amino-acides ou des lipides en dérivés précurseurs du glycogène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. P. G. SECKEL. *Endocrinology*, 1940, **26**, 97.
- [2] C. N. H. LONG. *Endocrinology*, 1942, **30**, 870.
- [3] C. Y. CHIU et D. M. NEEDHAM. *Biochem. J.*, 1950, **46**, 114.
- [4] C. Y. CHIU et D. M. NEEDHAM. *Ibid.*, 120.
- [5] C. A. VILLEE et A. B. HASTINGS. *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 673.
- [6] W. W. UMBREIT et N. E. TONHAZY. *Arch. Bioch. Biophys.*, 1951, **32**, 96.
- [7] W. W. UMBREIT et N. E. TONHAZY. *J. biol. Chem.*, 1951, **191**, 249.
- [8] W. W. UMBREIT et N. E. TONHAZY. *Ibid.*, 257.
- [9] J. A. RUSSEL et A. E. WILHELM. *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 713.
- [10] F. VERZAR. *Die Funktion der Nebennierenrinde*, Schwabe, édit., Bâle.
- [11] F. VERZAR et C. MONTIGEL. *Nature*, 1942, **149**, 49.
- [12] H. G. ALBAUM, A. I. HIRSHFELD, N. E. TONHAZY et W. W. UMBREIT. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **76**, 546.
- [13] E. J. CONWAY et D. HINGERTY. *Biochem. J.*, 1953, **55**, 447.
- [14] C. A. GOOD, H. KRAMER et M. SOMOGYI. *J. biol. Chem.*, 1953, **100**, 485.
- [15] H. G. HAGEDORN et B. N. JENSEN. *Biochem. Zeitschr.*, 1923, **135**, 46.
- [16] G. A. LE PAGE et W. W. PUMBREIT. In *Manometric Techniques and related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, par W. W. Umbreit, H. Burris et J. F. Stauffer, 1945, 159.
- [17] W. C. SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 293.

- [18] H. G. ALBAUM et W. W. UMBREIT. *J. biol. Chem.*, 1947, **167**, 369.
- [19] Z. DISCHE. *Mikrochemie*, 1930, **8**, 4.
- [20] C. D. KOCHARIAN et E. ROBERTSON. *J. biol. Chem.*, 1951, **190**, 481.
- [21] F. GROS, S. BONFILS et M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 990.
- [22] C. U. LOWE, L. W. WILLIAMS et L. THOMAS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, 818.
- [23] S. LEONARD. *Endocrinology*, 1953, **53**, 226.
- [24] W. KERPOLLA. *Endocrinology*, 1952, **51**, 192.
- [25] J. MENTHA, W. VOEBTLI et F. VERZAR. *Helv. Physiol. Acta*, 1948, **6**, 856.
- [26] D. INGLE et J. E. NEZAMIS. *Amer. J. Physiol.*, 1948, **152**, 598.
- [27] C. MONTIGEL et F. VERZAR. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1943, **1**, 137.
- [28] A. SASS KORTSAK, F. C. WANG et F. VERZAR. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1949, **7**, 18.
- [29] R. E. OLSON, F. A. JACOBS, D. RICHERT, S. A. THAYER, L. J. KOPP et N. J. WADE. *Endocrinology*, 1944, **35**, 430.
- [30] E. LEUPIN et F. VERZAR. *Biochem. J.*, 1930, **46**, 562.
- [31] G. R. BARTLETT et E. M. MAC KAY. *Proc. Roy. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **71**, 493.
- [32] L. E. BOZONIC, E. LEUPIN et F. VERZAR. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1949, **7**, 328.
- [33] S. KIT et E. S. GUZMAN BARON. *Endocrinology*, 1953, **52**, 1.
- [34] S. P. COLOWICK, G. T. CORI et M. W. SLEIN. *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 583.
- [35] M. E. KRAHL et C. F. CORI. *J. biol. Chem.*, 1947, **170**, 607.
- [36] A. WHITE, H. D. HOBERMAN et C. M. SZEGO. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 1049.
- [37] R. N. CAGAN, J. L. GRAY et H. JENSEN. *J. biol. Chem.*, 1950, **183**, 11.

ACTION DE LA GLIOTOXINE ET DE LA VIRIDINE SUR LES CULTURES DE TISSUS VÉGÉTAUX (*)

par M. DAHMEN (**) et J. MOUTSCHEN (***)

(Institut de Morphologie végétale de l'Université
de Liège, Belgique.)

I. — Introduction.

La présence de substances fongistatiques chez *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. fut pressentie pour la première fois par R. Falk en 1931 [1]. Celui-ci avait observé que les vieux troncs d'arbres sur lesquels vivait cette moisissure n'étaient jamais attaqués ni par *Merulius lacrymans*, ni par *Coniophora cerebella*.

C'est à R. Weindling (1932) [2] que l'on doit la mise en évidence d'une substance fongistatique produite par *Trichoderma viride*. Cette substance, désignée sous le nom de gliotoxine, a été isolée de divers champignons outre *T. viride*, notamment d'*Aspergillus fumigatus* Fres. et de *Penicillium terlikowskii* Zaleski.

Les propriétés antibiotiques de la gliotoxine ont été étudiées en 1942, par S. A. Waksman et H. Woodruff [3] et en 1943, par J. Johnson, W. Bruce et J. Dutcher [4].

Plus récemment, en 1945, P. W. Brian et J. C. Mc Gowan ont extrait de certaines souches de ce même champignon une autre substance particulièrement antifongique : la viridine [5].

Sa structure moléculaire, ses propriétés physico-chimiques et son activité biologique se sont révélées tout à fait différentes de celles de la gliotoxine.

De plus, on sait qu'il existe une substance isomère de cette seconde substance, isolée en même temps, mais en quantité beaucoup plus faible : la β -viridine. Cette dernière est toutefois moins antifongique que la forme α .

Trichoderma viride est une espèce extrêmement variable tant par ses caractères morphologiques que par ses potentialités bio-

(*) Manuscrit reçu le 2 avril 1954.

(**) Aspirant au Fonds National de la Recherche Scientifique.

(***) Assistant à l'Université de Liège, Boursier de l'Institut Inter-universitaire des Sciences Nucléaires.

chimiques. Depuis 1950, M. Dahmen a isolé de très nombreuses souches de *T. viride* du sol et de bois humide [6].

De ses études sur la microflore fongique de différents types de sols acides des hauts plateaux de l'est de la Belgique, il ressort nettement que *T. viride* est parmi les micromycètes les plus fréquents, sinon le plus fréquent, tant par le nombre de stations où il est présent que par la proportion du nombre de germes.

Au laboratoire, nous avons fréquemment constaté sa présence dans nos cultures de mousses et de fougères sur milieux gélosés, et même dans nos cultures de tissus de plantes supérieures ; partout nous avons remarqué que, là où il est présent, il se développe pratiquement à l'exclusion de tout autre.

Or, obtenir des cultures de ces différents organismes végétaux qui soient exemptes de moisissures ou de bactéries, présente de nombreuses difficultés, d'autant plus qu'il faut éviter rigoureusement toute méthode susceptible de modifier les cultures en quoi que ce soit. Par ailleurs, nous avions observé que les tissus repiqués sur des milieux de culture préalablement envahis par *Trichoderma viride* et stérilisés à nouveau, n'étaient presque plus infectés. Répété, le procédé nous donna de meilleurs résultats encore. Toutefois, avant d'exploiter ce procédé très simple, il convenait de tester le rôle du champignon dans nos cultures.

C'est pourquoi nous avons réalisé une série d'expériences sur l'action de la gliotoxine et de la viridine sur nos cultures et, parallèlement, nous avons vérifié la nature et l'ordre des altérations cellulaires que pouvaient y engendrer ces deux substances (1).

II. — Matériel et techniques.

1° CULTURES DE TISSUS.

A. MATÉRIEL VÉGÉTAL. — Dans tous les tests, nous avons utilisé le même matériel :

a) Pour les bryophytes :

Eurhynchium stokesii (spores) ;

Leptobryum piriforme (protothèques) ;

Brachythecium rutabulum (tiges feuillées) ;

Lunularia vulgaris (propagules).

b) Pour les ptéridophytes :

Polypodium aureum (spores) ;

(1) M. P. W. Brian nous a apporté son aide précieuse dans cette recherche. Qu'il trouve ici l'expression de toute notre gratitude. Nos plus vifs remerciements vont aussi à M. A. Monoyer pour les conseils éclairés qu'il nous a donnés au cours de nos travaux.

Adiantum capillus-veneris (spores) ;

Adiantum gracile (spores) ;

Athyrium filix femina (prothalles) ;

c) Pour les spermatophytes :

Daucus carota (racines en milieu solide) ;

Senecio vulgaris (racines en milieu liquide) ;

Humulus lupulus (tiges) ;

Bryonia dioica (tiges).

Nous avons fait des cultures de tissus de carotte et de seneçon pour tester l'influence que pourraient avoir la gliotoxine et la viridine sur les cultures de tissus de plantes supérieures. Dans les conditions habituelles, c'est-à-dire sans qu'il soit fait usage d'antibiotique, il n'est pas rare, en effet, d'obtenir avec ces deux matériels, le maximum de pourcentage de cultures aseptiques. Il n'en est guère de même pour tous les matériels, particulièrement pour les cultures de fragments de tige du type liane comme la bryone et surtout le houblon.

B. MILIEUX DE CULTURE. — Les mousses et les fougères sont cultivées indifféremment sur milieu de Detmer ou sur milieu de Dangeard dilués au tiers. Les cultures de tissus de plantes supérieures ont été réalisées suivant les techniques habituelles [7]. Comme aliment glucidique, nous avons utilisé le glucose pur (30 g par litre) et nous avons ajouté les substances de croissance aux concentrations suivantes :

Cystéine ou méthionine [8].	10 - 5
Aneurine.	10 - 6
Acide naphtyl-acétique.	10 - 7

La solution est gélosée à 12 g par litre.

2° EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES.

Les premiers essais ont été réalisés avec de la gliotoxine et de la viridine cristallisées que P. W. Brian a eu l'obligeance de nous procurer.

Dans la suite, nous avons extrait nous-mêmes les deux antibiotiques suivant les méthodes mises au point par cet auteur (1945 et 1946). [5, 9].

3° TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.

Le matériel est fixé par l'alcool acétique 3-1 et coloré par la méthode de Feulgen.

L'examen se fait en « squashes » avec l'objectif Fluotar Wild H I 100.

III. — Expérimentation et résultats.

Avant d'aborder la série de tests, nous précisons les trois points suivants :

1^o Les parasites contre lesquels nous avons généralement à lutter dans nos cultures. Ce sont, pour les cultures de mousses, d'hépatiques et de fougères, *Trichoderma viride*, *Cephalosporium asperum*, *Penicillium expansum* et *Fusarium* div. sp. : jamais de phycomycètes et très peu de bactéries ; dans les cultures de tissus de plantes supérieures : *Penicillium* div. sp. surtout *P. expansum*, *Aspergillus ruber*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichothecium roseum*, *Trichoderma viride*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium* div. sp. ; les phycomycètes sont très rares, mais les bactéries plus nombreuses.

2^o Les critères en fonction desquels nous avons exprimé nos résultats. Ce sont : la germination pour les spores, la croissance pour les propagules d'hépatiques, les protonemas de mousses et les prothalles de fougères, le développement des tiges feuillées de mousses et leur différenciation en protonemas, la néoformation et le développement des cals de plantes supérieures. Voici en bref la signification que nous donnons aux signes figurés dans les tableaux qui condensent les résultats obtenus pour chaque expérience :

a) Caractères des cultures de tissus :

- pas de germination ou de croissance.
- (+) croissance faible sans parasite.
- + croissance normale (ou d'aspect tel) sans parasite.
- +* croissance normale, culture faiblement parasitée.
- +** croissance normale, culture très parasitée.
- ++ croissance optimum.

b) Caractères des colonies des agents pathogènes (2) :

- pas de germination.
- (+) mycélium malingre.
- + mycélium normal sans conidie.
- ++ mycélium normal avec peu de conidies.
- +++ colonies normalement développées.

3^o Les matériels utilisés dans les tests cytologiques. Ce sont surtout : des pointes radiculaires d'*Allium cepa* et des bourgeons foliaires de *Brachythecium rutabulum*.

EXPÉRIENCE I. — A la suite de nos observations relatives à l'inhibition qu'exerce notre souche de *Trichoderma viride* sur les

(2) Observations basées sur les colonies de *Trichoderma viride* et de *Cephalosporium asperum* qui sont les moins sensibles aux substances envisagées ici.

parasites qui affectent nos cultures, nous avons repiqué systématiquement ces mêmes cultures sur des milieux préalablement ensemencés de notre souche ou de souches de *Trichoderma viride* d'autres provenances caractérisées par la production de l'un ou de l'autre des antibiotiques que cette moisissure produit (tableau I).

1^o *Trichoderma viride*, souche 705 A de la Mycothèque de l'Université de Liège, isolée d'une tourbière haute du Plateau de la Baraque Michel.

2^o *Trichoderma viride*, souche reçue de P. W. Brian, sous le n° 211, productrice de gliotoxine.

3^o *Penicillium terlikowskii*, souche reçue de P. W. Brian, sous le n° 536, productrice de gliotoxine.

4^o *Trichoderma viride*, souche reçue de P. W. Brian, sous le n° 213 E, productrice de viridine.

On laisse les cultures de ces champignons se développer pendant cinq jours, puis on stérilise. Après avoir répété cette

TABLEAU I.

SOUCHES	BRYOPHYTES						PTERIDOPHYTES						SPERMATOPHYTES			
	Spores		Protonemas		Tiges feuillées		Spores		Prothalles		Racines		Tiges			
	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.
1) Tr. vir. (Mc.Lg.)	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	+	-
2) Tr. vir. (gliot.)	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	+	-
3) Pen. terl. (gliot.)	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	+	-
4) Tr. vir. (vir.)	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	-	-	+	-
5) Témoin . . .	+	++	++*	+++	+**	+++	+	++	+	++	+	-	-	-	++*	+

manipulation une fois, le milieu de culture est prêt à être utilisé.

On voit d'après le tableau I que toutes les cultures témoins sont infectées (à l'exception des cultures de racines) et que les parasites en empêchent le développement normal. Notons toutefois que les semis de spores résistent toujours mieux à l'infection que les autres cultures.

D'autre part, aucune des cultures qui croissent sur milieux spéciaux n'est infectée et aucune ne montre d'anomalie. Les quatre types de milieux donnent le même résultat.

Cytologie. — Chez *Allium cepa*, aux basses concentrations, l'extrait total ne provoque aucune aberration cytologique ; les coefficients mitotiques des cellules traitées sont comparables à ceux des témoins.

Aux concentrations supérieures à 10^{-7} , les aberrations cyto-

logiques apparaissent avec grande fréquence (\pm 20 p. 100 des cellules). De nombreux noyaux apparaissent boursouflés, allongés ou simplement de forme atypique. Des masses chromatiques sont détachées des noyaux normaux ou de noyaux légèrement pycnotiques. Nous observons des figures de prophase dans lesquelles des filaments hypercolorés sont étalés dans le cytoplasme.

De nombreuses cellules montrent dans leur cytoplasme de grosses vésicules extérieurement fort colorées mais comportant des zones peu ou nullement colorées. Dans d'autres cellules, il ne subsiste qu'une fine poussière chromatique dont il est difficile de dire si elle provient de noyaux ou de chromosomes fragmentés.

Chez *Brachythecium rutabulum*, aux mêmes concentrations, on remarque de tels phénomènes, mais beaucoup moins fréquemment.

TABLEAU II.

CONCENTRATION de gliotoxine	BRYOPHYTES						PTERIDOPHYTES						SPERMATOPHYTES			
	Spores		Protonémas		Tiges feuillées		Spores		Prothalles		Racines		Tiges			
	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.	Cult.	Paras.
- 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
- 4	—	—	—	—	—	—	«+»	—	—	—	—	—	—	—	—	—
- 5	(+)	—	(+)	—	(+)	—	(+)	—	(+)	—	(+)	—	(+)	—	(+)	—
- 6	+	(+)	+	(+)	+	—	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	—	+	(+)
- 7	++	+	++	+	++	(+)	++	+	++	+	++	+	+	—	+	++
- 8	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	—	+	++
- 9	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	+	+++
- 10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	++	+++

En métaphase, les chromosomes pycnotiques sont ramassés le plus souvent au centre des cellules ; ils se montrent très fragmentés.

La figure 1 (planche) montre une cellule monstrueuse voisinant avec des cellules apparemment normales. De gros blocs chromatiques provenant d'un noyau fragmenté sont visibles.

La figure 2 (planche) montre plusieurs cellules dans lesquelles des fragments chromatiques, également pycnotiques, parfois très fins, sont bien visibles (concentration 10^{-4}). On aperçoit également un long filament chromatique sortant d'un noyau.

EXPÉRIENCE II. — La deuxième expérience consiste à étudier les effets de la gliotoxine sur les différents types de tissus végétaux envisagés.

A cet effet, nous avons réalisé plusieurs séries de milieux de cultures appropriés aux tissus à cultiver, contenant de la gliotoxine à des concentrations allant de 10^{-3} à 10^{-10} (tableau II).

Les doses de gliotoxine supérieures à 10^{-5} sont léthales pour l'hôte et pour l'agent pathogène, sauf dans le cas des tiges feuillées où, un mois après la mise en culture, quelques protonémas sont apparus. La concentration de 10^{-5} entrave la germination de tous les parasites mais permet un certain développement de la plante-hôte, d'une manière beaucoup plus ralentie cependant que dans les cultures-témoins. A la concentration de 10^{-6} et aux concentrations plus faibles, les cultures semblent se comporter normalement, mais à 10^{-6} déjà, on note quelques mycéliums de *Trichoderma viride* et de *Cephalosporium asperum* dans toutes les cultures, sauf dans les tiges feuillées où ils n'apparaissent qu'à 10^{-7} ; aux concentrations inférieures, le mycélium croît normalement mais ne porte pas de conidies sauf à 10^{-9} et à 10^{-10} dans les cultures de tiges feuillées de mousses, de prothalles de fougères et surtout dans les cultures d'organes de plantes supérieures où la richesse du milieu favorise fortement les parasites. Après quinze à vingt jours de culture cependant, les parasites dégénèrent et la plante prend remarquablement le dessus.

Cytologie. — Les effets cytologiques suivants ont été notés :

De 10^{-7} à 10^{-10} , le coefficient mitotique est normal ; aucune mitose aberrante n'a été détectée.

A 10^{-6} et à 10^{-5} , on relève les phénomènes suivants : quelques fragmentations chromosomiques (fragments pycnotiques) se présentant lors de la mitose, comme des extrachromosomes ; ponts interchromosomiques fréquents, visibles lors de l'anaphase ; distorsions fusoriales fréquentes aussi ; ces phénomènes se présentent beaucoup moins souvent chez *Brachythecium rutabulum* que chez *Allium*.

A 10^{-4} et à 10^{-3} , les phénomènes sont comparables à ceux notés à la suite de la première expérience : expulsions de fragments nucléaires dans le cytoplasme, fragmentations nucléaires, boursouflements ou tassemements nucléaires et noyaux pycnotiques ; fragmentations chromosomiques et présence d'extrachromosomes : présence dans le cytoplasme de petits anneaux Feulgen-négatifs au centre (fig. 1, planche).

Dans les cultures de *Brachythecium rutabulum* cultivées sur milieux additionnés de gliotoxine, les examens macroscopique et microscopique comparativement aux témoins montrent les faits suivants :

Aux concentrations de 10^{-7} à 10^{-10} , aucune mutation n'a été décelée : les protonémas sont peu divisés et les tiges feuillées sont du type témoin.

A la concentration de 10^{-6} , nous notons la présence de cellules subglobuleuses et fusiformes dans les protonémas ; ces mutants subglobuleux apparaissent sectorialement ; les tiges feuillées sont beaucoup plus nombreuses qu'aux concentrations plus faibles.

A la concentration de 10^{-5} , de nombreuses mutations cellulaires apparaissent ; le type protonémique globuleux ou subglobuleux devient très fréquent ; l'activité divisionnelle du protonéma reste très forte et par conséquent, les ramifications sont nombreuses ; on observe des bourgeonnements à partir de la cellule terminale du protonema ; de plus, la morphologie des chloroplastes est souvent très anormale (taille, mode de division, activité divisionnelle, etc.) ; à cette concentration, on note déjà plusieurs secteurs polyploïdes ; la nécrose est peu marquée.

A 10^{-4} , les plantes ne dépassent pas le stade protonémique ; les protonemas très peu abondants sont constitués de cellules sphériques à activité divisionnelle très marquée, fortement dissociables et généralement polyploïdes.

A 10^{-3} , la nécrose est générale.

EXPÉRIENCE III. — La même expérience que la deuxième fut

TABLEAU III.

CONCENTRATION de viridrine	BRYOPHYTES						PTERIDOPHYTES						SPERMATOPHYTE			
	Spores		Protonemas		Tiges feuillées		Spores		Prothalles		Racines		Tiges			
	Cult.	Paras	Cult.	Paras	Cult.	Paras	Cult.	Paras	Cult.	Paras	Cult.	Paras	Cult.	Paras	Cult.	Paras
0 - 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0 - 4	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	(+)	—	(+)	—	—	—
0 - 5	++	—	++	—	++	—	++	—	++	—	+	—	+	—	+	—
0 - 6	++	—	++	—	++	—	++	—	++	—	+	—	+	—	—	—
0 - 7	++	—	++	+	++	+	++	—	++	+	+	—	+	—	+	+
0 - 8	++	—	++	+	++	+	++	—	++	+	+	—	+	—	+	++
0 - 9	++	—	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	—	+	++
0 - 10	++	+	++	+	++	+	++	++	++	++	++	+	—	+	**	+++

reprise en utilisant cette fois la viridine (tableau III). Rappelons que cette dernière n'est pas bactéricide (P. W. Brian et al., 1946).

Seules les concentrations de viridine supérieures à 10^{-4} sont létales. A 10^{-4} , les bourgeons foliaires se développent tout aussi bien que ceux des plantes témoins, mais le reste de la tige feuillée brunit après avoir donné quelques protonemas. Les autres cultures apparaissent normales et les agents pathogènes sont totalement inhibés. Cette inhibition se maintient jusqu'à la concentration de 10^{-9} dans les semis de spores de mousses et jusqu'à 10^{-8} dans les semis de spores de fougères. Dans les autres cultures, l'inhibition se manifeste déjà beaucoup moins bien à 10^{-7} et à 10^{-8} ; le mycélium croît normalement sans toutefois donner de conidies mais il n'attaque pas la plante.

Cytologie. — La viridine s'est révélée beaucoup moins毒ique pour la cellule végétale que la gliotoxine alors qu'elle est beaucoup plus fongistatique. Chez *Allium*, aucune anomalie cellulaire n'a été observée aux concentrations inférieures à 10^{-4} .

A 10^{-4} et 10^{-3} , les phénomènes suivants ont été relevés : pycnoses, fragmentations nucléaires, cellules binucléées dans 50 p. 100 des cas et, en général, phénomènes identiques à ceux observés avec la gliotoxine. Notons aussi à ces concentrations une coloration du cytoplasme en jaune brunâtre.

L'observation macroscopique et microscopique de *Brachythecium rutabulum* montre les mêmes phénomènes que pour la gliotoxine, mais ceux-ci apparaissent à des doses différentes.

A des concentrations inférieures à 10^{-4} , aucune mutation n'est observée. A la dose de 10^{-4} , des cellules globuleuses apparaissent et à 10^{-3} , on note un grand nombre de cellules polyploïdes. A 10^{-2} , la léthalité est absolue.

EXPÉRIENCE IV. — Dans cette quatrième expérience, nous avons envisagé l'action des deux antibiotiques combinés.

Etant donné que nos cultures ne tolèrent ni la viridine à des concentrations supérieures à 10^{-5} , ni la gliotoxine à des concentrations supérieures à 10^{-7} , nous avons testé les effets de ces deux substances à des concentrations inférieures. Soit donc :

Viridine concentration 10^{-5}	gliotoxine concentration 10^{-7}
Viridine concentration 10^{-6}	+ gliotoxine concentration 10^{-8}
Viridine concentration 10^{-7}	+ gliotoxine concentration 10^{-9}
Viridine concentration 10^{-8}	+ gliotoxine concentration 10^{-10}
Viridine concentration 10^{-9}	
Viridine concentration 10^{-10}	

Il ressort de cette quatrième expérience que les concentrations des deux antibiotiques combinés les plus favorables tant du point de vue de la vitalité des cultures que de l'inhibition des parasites sont les suivantes :

Viridine	10^{-5} + gliotoxine	10^{-7}
Viridine	10^{-5} + gliotoxine	10^{-8}
Viridine	10^{-6} + gliotoxine	10^{-9}
Viridine	10^{-6} + gliotoxine	10^{-10}

Ce sont les doses les plus faibles qui, sans altérer la cellule végétale, inhibent le mieux les parasites les plus tenaces de nos cultures. Le fait d'avoir ajouté les deux substances l'une à l'autre n'a eu aucun effet cytologique.

IV. — Discussion.

Des observations précédentes, il ressort que les deux antibiotiques de *Trichoderma viride* aux fortes doses s'avèrent très toxiques pour la cellule végétale.

Chez *Allium cepa*, les doses supérieures à 10^{-5} pour la gliotoxine et à 10^{-4} pour la viridine sont léthales. Les doses plus faibles ne se montrent pas léthales mais stathmocinétiques ou radiomimétiques. Pour les doses inférieures à 10^{-6} pour la gliotoxine et à 10^{-4} pour la viridine, utilisée séparément, aucun phénomène cytologique n'a été constaté.

Ces observations furent répétées sur les autres matériaux végétaux expérimentés et plus particulièrement sur *Brachythecium rutabulum*. Dans le schéma 1 nous donnons le spectre d'action probable des deux antibiotiques.

D'autre part, lorsque les deux antibiotiques sont utilisés ensemble dans le même milieu de culture, leurs actions parasitaires se combinent qualitativement, la gliotoxine étant bactéricide et la viridine étant plus fongistatique que cette dernière.

Cependant la méthode empirique que nous utilisons est supé-

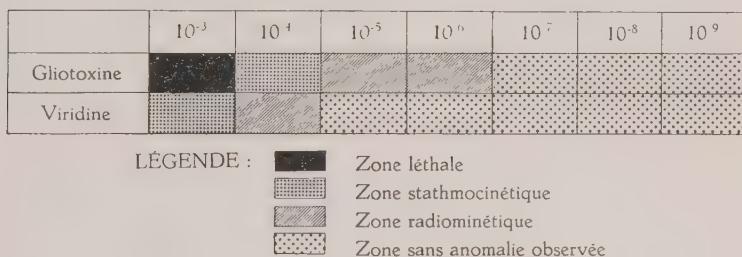


SCHÉMA 1.

rieure à cette méthode par les résultats qu'elle donne et par la facilité de son usage.

Après avoir inoculé les milieux de culture par *Trichoderma viride*, on laisse se développer celui-ci pendant cinq jours à environ 22° C ; après quoi, on stérilise le milieu et on renouvelle l'opération une ou deux fois suivant les cas. Après ce traitement, aucun parasite sensible à l'un ou à l'autre des antibiotiques de *Trichoderma viride* n'est capable de vivre sur ces milieux de culture.

Par contre, les tissus d'aucun des organismes végétaux étudiés ne montrent de changement sur ces milieux.

En général, d'ailleurs, un ou deux passages sur de tels milieux suffisent ; les cultures repiquées ensuite sur milieu normal sont exemptes de tout parasite.

Pour *Brachythecium rutabulum*, nous avons pu comparer les races mutées obtenues dans les expériences II (gliotoxine 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) et III (viridine 10^{-4}) avec des races mutées par les

radiations ionisantes [10]. Elles sont absolument stables. D'autre part, si aux concentrations inférieures, il existe un certain pourcentage de mutants, il ne doit guère, sinon pas, excéder celui qui apparaît chez cette espèce dans la nature. L'utilisation pratique de l'extrait total s'avère donc plus intéressante que celle des deux antibiotiques employés séparément ou combinés : il semble donc bien que, dans le cas de l'extrait total, il existe une action potentialisante, celle-ci étant d'une autre nature que celle qui est réalisée dans la combinaison des deux antibiotiques *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. FALK. *Mitt. Fortswirt.*, 1931.
- [2] R. WEINDLING. *Phytopath.*, 1932, **22**, 10.
- [3] S. A. WAKSMAN et H. B. WOODRUFF. *J. Bact.*, 1942, **44**, 373.
- [4] J. R. JOHNSON, W. F. BRUCE et J. D. DUTCHER. *J. Amer. chem. Soc.*, 1943, 65.
- [5] P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, H. G. HEMMING et J. C. MC GOWAN. *Annals appl. Biol.*, 1946, **33**, 2.
- [6] M. DAHMEN et J. RAMAUT. *Lejeunia*, 1951, **15**, 63.
- [7] R. J. GAUTHERET. *Man. techn. de cult. tiss. végét.*, Paris, Masson, 1942.
- [8] C. J. CAVILLITO et S. H. BAILEY. *Science*, 1944, **100**, 390.
- [9] P. W. BRIAN et H. G. HEMMING. *Annals appl. Biol.*, 1945, **32**, 3.
- [10] J. MOUTSCHEN. *La Cellule*, 1954, **56**, 181.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Cellule d'*Allium cepa* traitée par la gliotoxine (10^{-4}) montrant des fragments chromatiques pycnotiques ($1250 \times$).

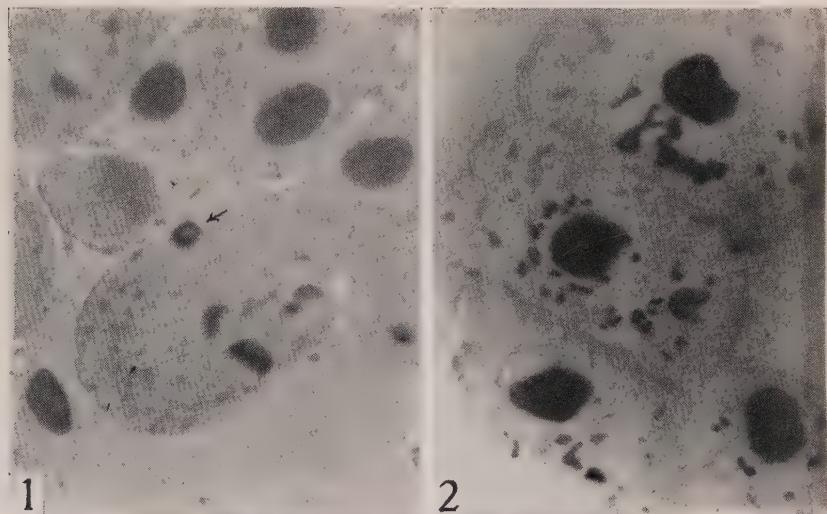
FIG. 2. — Cellules d'*Allium cepa* traitées par la gliotoxine (10^{-4}) montrant de longs filaments chromatiques pycnotiques sortis des noyaux ($1250 \times$).

FIG. 3. — *Brachythecium rutabulum* protonéma identique au témoin (gliotoxine 10^{-7}) [$300 \times$].

FIG. 4. — *Brachythecium rutabulum* protonéma mutant à ramifications secondaires subglobuleuses (gliotoxine 10^{-5}) [$300 \times$].

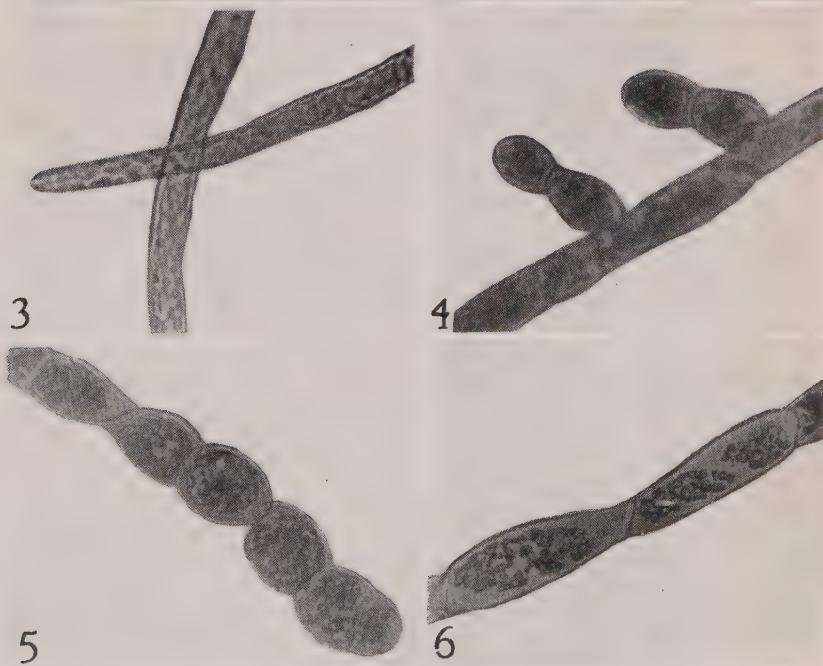
FIG. 5. — *Brachythecium rutabulum* protonéma globuleux nécrosé (gliotoxine 10^{-3}) [$300 \times$].

FIG. 6. — *Brachythecium rutabulum* type de protonéma polyploïde (gliotoxine 10^{-4}) [$300 \times$].



1

2



3

4

5

6

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 3 Juin 1954.

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.

COMMUNICATIONS

LA LONGÉVITÉ DES SPORES DE *B. ANTHRACIS* (PREMIER VACCIN DE PASTEUR)

par H. JACOTOT et B. VIRAT.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.)

C'est Pasteur qui a établi il y a quatre-ving-cinq ans, à propos de la flacherie des vers à soie, la possibilité pour certaines bactéries pathogènes de former des spores, et c'est lui qui a démontré que ces spores conservaient pendant plusieurs années la faculté de germer [1].

Le premier travail sur la sporulation de *B. anthracis* est un mémoire de Koch publié en 1877 [2].

Depuis cette lointaine époque quelques précisions ont été acquises relativement à la durée de survie des spores charbonneuses dans les matières organiques et dans divers milieux naturels ou artificiels de conservation.

Sur ce dernier point, le seul que concerne la présente note, Busson, von Székely et Graham-Smith ont constaté respectivement que les spores desséchées donnaient encore des cultures après dix-sept ans, dix-huit ans et demi et vingt-deux ans ; d'autre part, Novel et Reh ont observé que deux lots de spores conservés sur papier filtre donnaient encore des colonies, l'un après trente-cinq ans, l'autre après quarante et un ans, le type de ces colonies et le pouvoir pathogène des germes obtenus différant dans les deux lots [3, 4, 5, 6].

Ces délais sont, à notre connaissance, les plus longs qui aient été enregistrés ; ils dépassent notamment ceux dans lesquels on a pu observer la survie des spores charbonneuses prélevées dans les cadavres d'animaux, dans le sol et les eaux.

Nous rapporterons succinctement ici les résultats de l'étude que nous avons faite de suspensions de spores du premier vaccin de Pasteur

préparées à l'Institut Pasteur de Paris dans le laboratoire de Chamberland entre 1884 et 1900 (1). Il s'agissait de suspensions en bouillon destinées à l'exportation vers l'Europe centrale ; elles avaient été conservées en pipettes Pasteur effilées, à l'abri de la lumière, sans précautions particulières (2).

1^o En janvier 1954, les 100 échantillons dont nous disposions ont été semés en bouillon puis les tubes ont été placés inclinés dans l'étuve. Quatre échantillons ont donné une culture, avec un certain retard ; ils dataient respectivement de 1895, 1891, 1890 et 1887 ; les spores considérées étaient donc âgées de 58, 62, 63 et 66 ans.

Après repiquage sur gélose les quatre souches ainsi régénérées ont donné :

La souche 1895 des colonies de type R et des colonies de type S ;

La souche 1891 des colonies de type R ;

La souche 1890 des colonies de type R ;

La souche 1887 des colonies de type RS.

2^o L'étude de leur pouvoir pathogène a été faite sur le lapin, le cobaye et la souris ; on a inoculé des cultures de quarante-huit heures en bouillon, sous la peau, à la dose de 1/4 de centimètre cube pour les lapins, de 1/8 de centimètre cube pour les cobayes et les souris. Les résultats de ces essais sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Nous rappellerons que, classiquement, le premier vaccin de Pasteur inoculé aux doses indiquées tue toutes les souris en trente-six heures à trois jours et presque tous les cobayes en trois à huit jours ; au contraire, les lapins survivent presque tous à l'inoculation et presque

SOUCHES	LAPINS			COBAYES			SOURIS		
	Inoculés	Morts	Survivants	Inoculés	Morts	Survivants	Inoculées	Mortes	Survivantes
1895 R.	2	0	2	3	3 (24 à 72 h.)	0			
1895 S.				3	3 (3,5 à 5 j.)	0			
1891 R.	2	0	2	3	3 (3,5 à 5 j.)	0			
1890 R.	2	0	2	3	3 (3,5 3,5) (18 j.)	0	3	3 (36 h. à 3,5 j.)	0
1887 RS.	2	0	2	3	0	3	6	4 (2,5 à 4,5 j.)	2
Souche de référence dernier repiquage . . .	4	1	3	4	3	1			

(1) Les titulaires successifs du laboratoire ont été Chamberland, Jouan et Staub, qui nous y a précédé.

(2) Nous remercions ici notre collègue le Dr Didier Bertrand, qui a bien voulu identifier le liquide dans lequel les spores avaient été placées.

tous sans réaction générale ni locale. (Souche de référence au bas du tableau.)

Il apparaît ainsi que les trois premiers échantillons avaient conservé à peu près intégralement leur pouvoir pathogène, alors que celui de l'échantillon le plus ancien s'était fortement affaibli.

3^e Enfin, l'on a recherché si les survivants des épreuves précédentes, lapins et cobayes, avaient acquis l'immunité vis-à-vis d'une souche plus virulente du charbon. A cet effet, quarante jours après l'inoculation de premier vaccin régénéré, les trois cobayes qui avaient résisté à la souche 1887 ont reçu sous la peau 1/8 de centimètre cube d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon de deuxième vaccin de Pasteur ; deux sont morts en quatre jours et demi, le troisième a survécu après avoir fortement réagi. Quant aux lapins qui, tous, avaient supporté sans troubles les injections des quatre souches régénérées, ils sont morts dans des délais compris entre deux et cinq jours et demi, après inoculation dans le derme de 1/10 de centimètre cube d'une suspension à 10^{-4} de spores pleinement virulentes ; comparativement, de deux lapins qui avaient résisté à l'inoculation avec la souche de référence, l'un a succombé et l'autre a résisté à l'épreuve avec la souche virulente.

Conclusion. — Parmi 100 échantillons de spores charbonneuses (premier vaccin de Pasteur) qui ont été mises en suspension dans du bouillon entre les années 1884 et 1900, dans le service de Chamberland, 4 possédaient encore leur pouvoir germinatif en janvier 1954. La souche la plus ancienne, âgée de 66 ans, avait perdu tout pouvoir pathogène pour le cobaye et elle ne tuait que 4 souris sur 6 ; les trois autres souches âgées respectivement de 63, 62 et 58 ans avaient conservé intégralement, ou à peu près, leur virulence originelle. Aucune de ces souches n'a permis aux lapins qui lui avaient résisté de surmonter les suites d'une épreuve ultérieure avec des spores charbonneuses pleinement virulentes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PASTEUR. *Etudes sur les maladies du ver à soie*. Paris, 1870, p. 168, 228, 256.
- [2] R. KOCH. *Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 1877, **11**, 277.
- [3] B. BUSSON. *Zentralbl. Bakt.*, 1911, **58**, 505.
- [4] A. VON SZEKELY. *Zeitschr. Hyg.*, 1903, **44**, 359.
- [5] G. S. GRAHAM-SMITH. *J. Hyg.*, 1930, **30**, 213.
- [6] E. NOVEL et T. REH. *Schweiz. Zeitschr. Path. Bakt.*, 1947, **40**, 180.

**QUELQUES CONSIDÉRATIONS
SUR LA BRUCELLOSE DU LIÈVRE
A PROPOS DE HUIT CAS IDENTIFIÉS EN FRANCE**

par H. JACOTOT et A. VALLÉE

(Aide-technique : A. LE PRIOL.).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.)

Nous avons rapporté ici, il y a trois ans, l'observation des deux premiers cas de brucellose du lièvre identifiés en France [1, 2]. Il s'agissait d'animaux originaires de Picardie. Depuis cela, de la même région, nous sont parvenus entre février 1951 et février 1953 quatre autres lièvres atteints eux aussi de brucellose ; ainsi donc, selon toute apparence, il existe ou existait naguère dans un périmètre étroit de la région comprise entre Amiens et Abbeville un véritable foyer de brucellose dans cette espèce sauvage.

Plus récemment, en décembre 1953, nous avons reçu, envoyés l'un de la Haute-Marne, l'autre d'Eure-et-Loir, deux lièvres chez lesquels nous avons encore identifié la maladie.

L'examen de ces six derniers animaux a fait l'objet d'une relation à laquelle nous nous permettons de renvoyer le lecteur [3]. Nous rappellerons seulement que, dans l'espèce considérée, la brucellose est généralement caractérisée par la formation d'importantes collections purulentes et, chez les femelles, par l'évolution de métrite suppurée.

Les brucelles que nous avons isolées de ces huit cas possédaient en commun la propriété de se multiplier d'emblée en l'absence de CO_2 , et celle de pousser sur milieu additionné de thionine ; ces propriétés se sont montrées parfaitement stables. Leurs autres caractères différentiels n'ont pas présenté au long des mois la même fixité ; ceci n'est pas pour surprendre, surtout en l'espèce des brucelles, mais il en est résulté parfois quelque incertitude sur le type microbien et quelques difficultés à classer le germe. Nous avons adressé ces huit souches de brucelles aux Drs Renoux de l'Institut Pasteur de Tunis et Stableforth de l'Institut de Weybridge qui sont parmi les bactériologistes les plus qualifiés pour l'identification des germes du genre *Brucella* ; nous les remercions vivement ici de leur aimable collaboration.

On trouvera réunis dans le tableau ci-joint, et datés, les résultats des tests pratiqués par chacun d'eux et par nous-mêmes à Paris. La détermination du type a été basée sur l'étude des caractères huddelsoniens (Paris-Tunis-Weybridge), la recherche de l'uréase (Paris-Tunis), la classification sérologique (Weybridge-Tunis), l'épreuve au diéthyl-dithiocarbamate de soude (Tunis).

La lecture de ce tableau conduit aux constatations suivantes :

a) Six souches sur huit appartenaient ou se rattachaient de près à l'une des deux variétés de *Br. suis* ;

**Identification de huit souches de Brucelles
isolées chez le lièvre en France.**

	PARIS	TUNIS	WEYBRIDGE	
Somme 1. . .	<i>Melitensis</i> (nov. 1950).	<i>Suis</i> (nov. 1953).	<i>Suis</i> (oct. 1953).	<i>Melitensis</i> atypique (avril 1953).
Somme 2. , .	<i>Melitensis</i> ou <i>Intermedia</i> (oct. 1950).	<i>Abortus</i> (nov. 1953).	<i>Abortus</i> (oct. 1953).	<i>Abortus</i> (avril 1953).
Somme 3. . .	<i>Suis danois</i> (mai 1951).	<i>Suis</i> (nov. 1953).	<i>Intermedia</i> (oct. 1953).	<i>Suis danois</i> (avril 1953).
Somme 4. . .	<i>Suis danois</i> (déc. 1951).	<i>Suis</i> (nov. 1953).	<i>Suis</i> (oct. 1953)	Inclassable (avril 1953).
Somme 5. . .	<i>Suis danois</i> (sept. 1952).	<i>Suis</i> (nov. 1953).	<i>Suis</i> (oct. 1953).	<i>Suis danois</i> atypique (déc. 1952).
Somme 6. . .	<i>Suis danois</i> (fév. 1953).	Inclassable (nov. 1953).	<i>Suis</i> (oct. 1953).	<i>Suis danois</i> (avril 1953).
Haute-Marne .	<i>Suis danois</i> (janv. 1954).	<i>Suis danois</i> (janv. 1954).	<i>Suis danois</i> (janv. 1954).	<i>Suis danois</i> (mars 1954).
Eure-et-Loir .	<i>Suis danois</i> (janv. 1954).	<i>Suis danois</i> (janv. 1954).	<i>Suis danois</i> (janv. 1954).	<i>Suis danois</i> (mars 1954).

b) Une souche s'est présentée par deux fois avec plusieurs caractères du type *melitensis* ;

c) Une autre qui, à la sortie de l'organisme, possédait certains caractères du type *melitensis*, s'est classée ultérieurement dans le type *abortus*.

Ces constatations sont en concordance avec les observations de Bur-gisser, en Suisse [4]. Deux notions en découlent : la plasticité ou un certain degré de variabilité du type brucellien au sein du genre d'une part et, d'autre part, la tendance des brucelles à revêtir dans l'organisme du lièvre les caractères du type *suis*. Sur le premier point, G. Renoux a réuni des éléments d'appréciation d'une valeur indiscutable ; nous pensons avec lui qu'il conviendrait de considérer les divers types de brucelles comme de simples variétés d'une espèce unique [5].

Mais le fait que les brucelles du lièvre sont en grande majorité du type *suis* mérite de retenir l'attention. En effet, en Suisse où 10 p. 100 des lièvres autopsiés ces années dernières étaient atteints de brucellose, *Br. suis* est considérée comme inexistante, et en France où nous avons dépisté la maladie du lièvre en des régions éloignées les unes des autres, cette variété de brucelle n'a jamais été isolée dans les autres espèces animales. On est tenté d'admettre que le lièvre s'y contamine au contact des ruminants ou de l'homme, qu'il y est touché ou par *Br. abortus* ou par *Br. melitensis*, lesquelles dans son économie, et au cours d'un processus pathologique vraisemblablement long, se transforment en *Br. suis*.

Enfin l'aptitude commune au porc et au lièvre d'imprimer certaines propriétés biochimiques aux brucelles pourrait comporter comme corollaire un état comparable de réceptivité de ces deux espèces animales au

germe ainsi modelé ; en fait, tout récemment Herluf Bendtsen, M. Christiansen et Axel Thomsen ont établi que des souches de brucelles issues du lièvre (et qui possédaient les caractères de *Br. suis* (var. danoise) étaient, contrairement aux souches bovines, très pathogènes pour la truite et provoquaient chez elle l'avortement [6]. On est ainsi conduit à se demander si, dans les régions où la brucellose du porc n'existe pas mais où se rencontrent des lièvres brucelliques, ceux-ci ne pourraient être un jour à l'origine de la contamination des porcins.

EN RÉSUMÉ. — Depuis trois ans environ, nous avons identifié en France 8 cas de brucellose du lièvre dont 6 dans la Somme, 1 dans la Haute-Marne et 1 en Eure-et-Loir.

De par leurs caractères biochimiques et sérologiques, 6 des 8 brucelles isolées appartenaient ou se rattachaient de très près à l'une des deux variétés de *Br. suis*.

La brucellose du porc n'existant pas en France et *Br. suis* n'y ayant jamais été isolée dans les espèces domestiques, il n'est pas illogique de penser qu'après avoir pénétré dans l'organisme du lièvre, les brucelles des types rencontrés dans le pays, *abortus* ou *melitensis*, subissent des modifications qui les orientent vers le type *suis*, dont les caractères biochimiques et antigéniques se substituent aux leurs le plus souvent.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. JACOTOT et A. VALLÉE. Ces Annales, 1951, **80**, 99.
- [2] H. JACOTOT et A. VALLÉE. Ces Annales, 1951, **80**, 214.
- [3] H. JACOTOT et A. VALLÉE. Bull. Acad. Vétér. France, séance du 20 mai 1954.
- [4] H. BURGESSER. Rev. Path. gén., 1954, p. 124.
- [5] G. RENOUX. Ces Annales, 1952, **82**, 289.
- [6] H. BENDTSEN, M. CHRISTIANSEN et A. THOMSEN. Nordisk Veterinaermecd., 1954, **6**, 11.

RECHERCHE DES BRUCELLA DANS LE SANG PAR INOCULATION A L'EMBRYON DE POULET

par L. CARRÈRE et J. ROUX.

(Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Montpellier et Centre de Recherches sur la Fièvre Ondulante.)

Les techniques habituellement proposées pour la détection des *Bruccella* dans le sang sont loin d'être satisfaisantes dans tous les cas. Dans les brucelloses aiguës, en période de pyrexie, les résultats sont bons, sous réserve d'utiliser une méthode adéquate : celle de Castaneda, utilisant dans un même flacon un milieu liquide et un milieu solide, résout très élégamment le problème du repiquage fréquent, sans

risque de contamination, du milieu liquide sur le milieu solide, et a notre préférence.

Malgré cela les résultats positifs diminuent nettement dès qu'on a passé le stade initial de la maladie. Selon Lisbonne (1938), *Brucella melitensis* est retrouvée dans 100 p. 100 des cas dans la première décade de la maladie, dans 24 p. 100 dans la seconde décade, dans 6 p. 100 dans la troisième. Enfin, bien que Lisbonne et Janbon aient signalé depuis longtemps des hémocultures positives lorsque le malade est absolument apyrétique, ce fait reste rare.

Dans les brucelloses chroniques, on peut dire que la présence, dans l'organisme, des *Brucella*, démontrée par leur découverte exceptionnelle dans quelques gîtes (vésicule biliaire, ganglions), n'est jamais prouvée par l'hémoculture.

Ces résultats défavorables sont dus à plusieurs facteurs : très petit nombre et passage intermittent des *Brucella* dans le sang, apport dans le milieu de culture du sérum des malades contenant des anticorps anti-*Brucella*, mauvaise croissance des *Brucella* dans les milieux liquides dont certains, en outre, contiennent des substances inhibitrices (certaines tryptoses en particulier).

L'inoculation du sang au cobaye ne donne pas des résultats notamment différents : la sensibilité de cet animal est variable selon les sujets ; il faut un nombre de cellules bactériennes relativement important pour l'infecter ; enfin son prix de revient ne permet pas de répéter fréquemment les examens, ce qui est indispensable.

Par contre des recherches récentes ont établi la supériorité de l'inoculation à l'embryon de poulet pour isoler les *Brucella* du sang. Depuis que Goodpasture et Anderson (1937) [5], puis Budding et Womack (1941) [1], ont démontré qu'on pouvait cultiver *Brucella abortus* sur membrane chorio-allantoïde, l'embryon de poulet a été souvent utilisé pour étudier l'efficacité de certaines substances thérapeutiques sur les *Brucella*. Récemment Gay et Damon (1950) [4] ont précisé, par de nombreuses expériences, les meilleures conditions de l'utilisation des œufs embryonnés, et inoculé du sang de malades. Damon, Bunnell, Gay et Hutchings [3] ont comparé les résultats fournis par l'hémoculture en bouillon-tryptose, l'injection au cobaye et l'inoculation à l'embryon de poulet, pour conclure à la supériorité de cette dernière méthode. Celle-ci prend toute son importance à la suite des recherches de Criscuolo et Ramacciotti en 1953 [2].

Dans 19 cas aigus ces auteurs ont isolé 15 fois les *Brucella* sur embryon de poulet (6 fois seulement par hémoculture en milieu au foie). Ils ont pu isoler les *Brucella* dans 12 cas de brucelloses chroniques (5 *B. melitensis*, 7 *B. abortus*), alors que l'hémoculture en milieu au foie a été constamment négative. Ils utilisent des œufs de cinq jours et inoculent 0,5 cm³ de sang dans le sac vitellin ; 5 œufs sont nécessaires pour chaque échantillon de sang. Le sac vitellin est ponctionné à partir du troisième jour, tous les deux jours, jusqu'au douzième jour, et ensemencé sur gélose au foie. L'œuf est ouvert le douzième jour, le liquide vitellin est ensemencé, ainsi que les organes de l'embryon : foie, rate et moelle osseuse.

Diverses raisons nous ont conduits à modifier cette technique : le nombre d'œufs dont nous disposons étant limité, il est préférable de

répéter les prises de sang chez le malade et d'utiliser chaque fois un seul œuf ; à noter que les œufs peuvent être ouverts plus tôt, lorsque le germe cherché est *Brucella melitensis*, ce qui est presque toujours le cas pour nous.

TECHNIQUE. — 5 ml, au moins, de sang recueilli sur citrate de soude, ou mieux sur héparine, sont centrifugés dix minutes à 3 000 tours. Le culot est repris dans 10 ml d'eau distillée et abandonné trente minutes, jusqu'à lyse totale des hématies. On centrifuge à nouveau et le culot, très réduit cette fois, est repris dans 0,5 ml d'eau salée à 9 p. 1 000. Cette émulsion est inoculée dans le sac vitellin d'un œuf embryonné de cinq jours. Après incubation de six jours, à 38°, l'embryon et le contenu du sac vitellin sont prélevés. On ensemence sur milieu albimi agar le contenu vitellin, le foie, la rate et la moelle osseuse de l'embryon. Les colonies de *Brucella* poussent en deux à quatre jours. L'embryon est généralement tué au troisième ou quatrième jour : cependant un embryon vivant n'implique pas l'absence de *Brucella*.

Nous avons également constaté (ce qui a été vu par Criscuolo et Ramacciotti) que la culture du sac vitellin peut être négative alors que la culture des organes de l'embryon est positive. Il est donc important d'ensemencer ces organes, le foie étant celui qui donne le plus fidèlement une culture positive.

Les cultures obtenues sont assez souvent dissociées (pourcentage élevé de formes R) et atypiques : on observe fréquemment la forme bacillaire des *Brucella*. Mais après un ou deux repiquages les germes reprennent rapidement leurs caractères habituels.

RÉSULTATS. — Les brucelliens chroniques sont des malades chez qui la méthode devait être essayée de préférence ; en effet, ces malades présentent des troubles plus ou moins importants, d'allure très diverse, que des critères biologiques fort discrets ne permettent pas toujours de rattacher à l'infection brucellique. Une étude de la brucellose chronique, récemment faite par Janbon et Bertrand [6], montre clairement les difficultés de ce diagnostic. Les hémocultures sont constamment négatives, le séro-diagnostic de Wright, le test opsono-cytophagique sont négatifs ou très douteux. Seule l'intra-dermo-réaction à la mélinite est positive, mais on sait que l'état allergique qu'elle révèle n'implique pas obligatoirement une infection actuellement en activité. On conçoit donc l'importance primordiale de la mise en évidence d'un germe chez ces malades pour affirmer un diagnostic.

Nous avons ainsi pratiqué à ce jour des inoculations en œuf embryonné chez 13 malades (1) présentant une intradermo-réaction à la mélinite positive (brucelliens chroniques possibles). Dans 4 cas nous avons obtenu le germe en cause : 3 fois *Brucella melitensis*, 1 fois *Brucella abortus*, tandis que les hémocultures par notre méthode habituelle étaient négatives.

La présence des germes dans le sang des malades étant très inconstante, il est nécessaire de répéter quotidiennement les prélèvements

(1) La majorité d'entre eux était hospitalisée à la Clinique des Maladies infectieuses (professeur Janbon).

pendant quelques jours. La technique que nous proposons n'utilisant qu'un seul œuf embryonné par échantillon permet cette répétition des examens.

Bien que le nombre de cas positifs que nous rapportons soit faible et qu'il soit trop tôt pour donner des statistiques, ces résultats nous semblent suffisants pour affirmer le grand intérêt de la méthode. C'est pour l'instant la seule, dans les cas douteux ou difficiles, qui permette de faire la preuve indiscutable de l'étiologie brucellienne et de préciser l'espèce de *Brucella* en cause. Nous pensons par contre que, dans les brucelloses aiguës, l'hémoculture habituelle garde tout son intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. J. BUDDING et C. F. WOMACK. *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 213.
- [2] E. CRISCUOLO et F. RAMACCIOTTI. *El dia Medico*, 1953, **25**, 24.
- [3] S. R. DAMON, D. BURNELL, K. GAY et L. M. HUTCHINGS. *Publ. Health Rep.*, 1952, **67**, 9
- [4] K. GAY et S. R. DAMON. *Publ. Health Rep.*, 1950, **65**, 1187.
- [5] E. W. GOODPASTURE et L. ANDERSON. *Am. J. Path.*, 1937, **13**, 149.
- [6] M. JANBON et L. BERTRAND. *Congrès de Médecine méditerranéenne*, Barcelone, 1953.

DISSOCIATION NOUVELLE DU BACILLE TUBERCULEUX. CONSTANCE OU VARIATION DU POUVOIR PATHOGÈNE DES MYCOBACTÉRIES VIRULENTES ?

par JEAN DESBORDES, ÉTIENNE FOURNIER et DENISE ALIX.

(*Laboratoire du Dr Paraf, Centre Emile Roux.*)

Il est commode, pour l'étude du pouvoir pathogène de certaines Mycobactéries virulentes, de comparer le comportement des souches étudiées par rapport à des souches-témoins.

Il s'agit le plus souvent soit de l'apparition du pouvoir tuberculini-sant sur l'animal (cobayes), soit de la réponse à des tests cyto-chimiques (réactions de Dubos-Middlebrook ou de Desbordes et Fournier, ou de Wilson et Hauduroy).

Chaque laboratoire possède en général sa collection de souches classée par rapport à des souches-tests de réputation internationale. Pour notre part nous avions choisi avec de nombreux autres expérimentateurs du reste (si l'on en juge d'après les publications relevées dans la littérature ou les communications personnelles de divers chercheurs) comme souches-tests de virulence la souche H37 RV reçue d'U. S. A. vers 1945, et la souche Brévannes, reçue de l'Institut Pasteur, en 1944.

Ces souches manipulées depuis une dizaine d'années tuberculini-saient le cobaye toujours dans les mêmes conditions. La seule remarque que nous faisions était la baisse d'activité périodique de la souche

Brévannes qui nous obligeait à quelques passages sur l'animal de temps à autre, pour retrouver un niveau constant d'activité. Par contre la souche H37RV semblait plus stable. Puis, depuis deux ans environ nous avons été frappés de la chute de la puissance de cette dernière et il nous a fallu passer également par l'inoculation à l'animal (cobaye).

Entre 1944 et 1950 nos souches étaient repiquées soit sur milieu de Löwenstein, préparé à l'Institut Pasteur, soit sur pomme de terre.

Puis, depuis 1950 et surtout depuis deux ans, nous avons utilisé de plus en plus fréquemment le milieu synthétique au Tween (milieu de Dubos).

Vers 1949 nous avons commencé à étudier les réactions de fixation et de métachromasie des Mycobactéries virulentes en utilisant le rouge neutre, puis le bleu de Nil.

Depuis 1952 nous avons mis au point notre réaction dite au bleu de Nil, dont la constance des résultats nous avaient frappés, et nos souches, pour des raisons de mise au point de technique ou d'emploi de colorants divers, ont été testées plusieurs fois chaque semaine.

Or, à notre grand étonnement un phénomène nouveau semble être apparu : d'année en année les souches H37RV et Brévannes révèlent une diminution constante de l'aptitude au virage métachromatique des colorants alcalins employés à leur zone de demi-virage et en même temps une augmentation quasi parallèle de la période anté-allergique lors de l'inoculation au cobaye dans des conditions d'emploi identique.

A nos yeux tout se passe comme si ces souches, qui paraissent avoir manifesté pendant un temps fort long (près d'un demi-siècle pour la souche H37RV) une constance de leur aptitude pathogène, révélaient à notre époque une chute brutale de leur virulence.

Sans vouloir donner une explication aux faits que nous avons observés, nous avons l'attention attirée par l'action possible des substances tensio-actives si largement maniées maintenant dans les laboratoires. L'abus des repiquages en milieu tensio-actif (Dubos), le fait que la verrerie de laboratoire, y compris les tubes à essais, sont peu à peu recouverts d'une pellicule de corps tensio-actifs, le fait que même l'eau des robinets voit sa tension superficielle varier, nous fait retenir l'hypothèse que ces substances arrivent à modifier les caractères des souches de Mycobactéries conservées et repiquées dans nos laboratoires.

Nous pensons que le problème est important, ne serait-ce que pour les causes d'erreur qui pourraient se produire lorsqu'on étudie les incidences de certains essais chimiothérapeutiques sur la maladie tuberculeuse expérimentale du cobaye.

Signalons pour terminer que, *par contre*, la constance des réponses du BCG aux divers tests *in vivo* et *in vitro* s'oppose aux variations des souches H37RV et Brévannes.

Il nous apparaît souhaitable que nos collègues des divers laboratoires de recherches vérifient ou infirment ce que nous avons observé pour notre part d'une façon incontestable.

LES GROUPES SANGUINS DES COBAYES

par A. EYQUEM et E. JOCHEM.

(Institut Pasteur, Centre d'Etudes des Groupes Sangins des Animaux,
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

Les recherches effectuées par Hektoen, Weszczky, Fleischer, Lawson et Redfield ont conclu à l'absence d'agglutinines décelant des antigènes de groupes sanguins chez le cobaye. En utilisant des iso-immunséums ou des hétéro-agglutinines, Boyd et Walker puis Wiener n'ont pas pu établir l'existence d'antigènes érythrocytaires chez le cobaye.

En 1950, Mynors, Heard et Coombs ont réalisé des iso-immunisations de cobayes femelles à l'aide de globules rouges de cobayes mâles avec lesquels elles avaient été accouplées. Cette immunisation n'a pas entraîné l'apparition d'iso-agglutinines. La recherche de celles-ci a été effectuée soit à l'aide de la réaction indirecte de Coombs avec un sérum de lapin anti-sérum de cobaye, soit à l'aide de la réaction de fixation du complément, ou en utilisant les globules rouges trypsiniés. Les jeunes cobayes nés de ces femelles immunisées n'ont pas présenté de signe pathologique caractéristique d'un syndrome hémolytique et la réaction directe de Coombs effectuée sur leurs globules rouges s'est toujours montrée négative.

Cependant, il convient de rappeler que Landsteiner, en immunisant des cobayes domestiques (*Cavia porcellus*, Linné) à l'aide de globules rouges de cobayes brésiliens (*Cavia rufescens*, Erxl), a obtenu des agglutinines actives sur les globules rouges de cobayes brésiliens et sur ceux des animaux provenant du croisement entre les deux espèces.

Holzer, en 1935, a obtenu des résultats analogues et a observé que l'agglutination très forte avec les globules rouges de cobayes brésiliens est faible avec celle des globules rouges des hybrides F_1 et plus faible encore avec les hybrides F_2 ne possédant qu'un quart de caractères brésiliens. De plus, le sérum de bœuf absorbé à l'aide de globules rouges de cobayes domestiques agglutine encore les globules rouges de cobayes brésiliens, et inversement ; mais il n'est pas possible d'établir à l'aide de la réaction de précipitation des différences entre les deux espèces.

Bien que le cobaye constitue un animal susceptible de permettre la réalisation de certaines expériences faisant intervenir les incompatibilités antigéniques fœto-maternelles, il est difficile de compter sur les croisements entre cobayes domestiques et cobayes brésiliens, car les descendants mâles de ces croisements passent pour être stériles. C'est pourquoi nous estimons que la mise en évidence d'antigènes de groupes sanguins chez le cobaye domestique présente un certain intérêt.

Au cours de l'étude de certaines hémagglutinines dont la recherche était basée sur l'absence d'iso-agglutinine chez le cobaye, nous avons observé certaines anomalies qui nous ont fait découvrir différentes iso-agglutinines.

En mettant en contact en tubes 0,10 ml du sérum de 33 cobayes normaux dans un premier temps et 0,05 ml d'une suspension de globules rouges de 20 de ces 33 cobayes normaux, nous avons observé une agglutination dans les cinq minutes qui suivent, agglutination renforcée par une centrifugation à 1 200 tours pendant deux minutes à 20°.

Au cours de cette première série, les globules rouges de 2 cobayes ont été respectivement agglutinés avec une intensité comprise entre + et +++ par le sérum de 6 et 11 cobayes. Il n'y avait pas d'auto-agglutination. L'agglutinine mise en évidence résistait aux congélations et décongélations successives. Elle résiste au chauffage à 56° pendant trente minutes.

TABLEAU I — Fréquence d'iso-agglutinines chez le cobaye.

G. R. N° COBAYE	NOMBRE TOTAL DES SERUMS EXAMINÉS	NOMBRE DE SERUMS		
		FORTÉMENT AGGLUTINANT	FAIBLEMENT AGGLUTINANT	N'AGGLUTINANT PAS
85	33	6	8	19
98	27	II	2	14
12	61	26	4	31
43	61	60	4	17

Nous avons précisé la fréquence des agglutinines et agglutinogènes mis en évidence, en recherchant l'agglutination des globules rouges de ces deux cobayes par le sérum d'autres cobayes et nous avons réalisé d'autres réactions croisées entre sérums et globules.

Au total, sur 118 cobayes examinés, nous avons constaté que 4 d'entre eux ont leurs globules rouges (n°s 12, 43, 85, 98) agglutinables par le sérum d'autres cobayes.

Si les agglutinogènes ainsi révélés semblent d'une faible fréquence, par contre les agglutinines correspondantes existent dans le sérum d'environ 40 p. 100 des cobayes adultes normaux.

Il est difficile d'évaluer le nombre des antigènes en cause et décelables à l'aide de ces agglutinines naturelles car toutes les épreuves d'absorption n'ont pu être réalisées.

On doit cependant estimer qu'il existe au moins 3 antigènes érythrocytaires décelables par iso-agglutination. De plus, nous avons observé que les globules rouges des cobayes n°s 12 et 43 étaient agglutinés par le sérum de souris et de rat normal qui se révèle ordinairement incapable d'agglutiner les globules rouges de cobaye.

BIBLIOGRAPHIE

- BOYD et WALKER. *J. Immunol.*, 1934, **26**, 435.
 FLEISCHER et WALKER. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1926, **49**, 121.
 HEKTOEN. *J. inf. Dis.*, 1907, **4**, 287.
 F. J. HOLZER. *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1935, **84**, 170.
 K. LANDSTEINER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1931, **28**, 981.
 L. S. MYNORS, D. H. HEARD et R. R. A. COOMBS. *J. Hyg.*, 1950, **48**, 458.
 VESZECZKY. *Biochem. Zeitschr.*, 1920, **107**, 159.

DISPOSITIF D'ALIMENTATION A COURANT CONSTANT POUR ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER

par C. CARAVEL, J. DUCLOZ et J. GROULADE.

(*Faculté des Sciences, Centre de Transfusion sanguine, Grenoble.*)

Lorsqu'on alimente une cuve à électrophorèse sur papier par un générateur à courant continu (batterie d'accumulateurs ou bloc redresseur alimenté par le secteur et suivi ou non de filtres) on constate que le courant traversant les bandes subit des variations au cours de l'opération. Ceci tient à de nombreuses causes, mal connues d'ailleurs, pouvant agir dans un sens ou dans l'autre ; en pratique, des écarts de 20 à 30 p. 100 sont fréquemment constatés.

Ces phénomènes sont évidemment gênants car ils influent, entre autres, sur la longueur de séparation, donc sur la durée de l'essai. La solution, simple en apparence, d'un réglage manuel ne peut être retenue, car elle entraînerait une surveillance semi-permanente des appareils pendant les heures que dure une séparation usuelle. C'est pour obvier d'abord à ces inconvénients que nous avons mis au point un dispositif pratique permettant, à partir du secteur, l'alimentation à courant constant des cuves à électrophorèse que l'un de nous utilise journallement ; le prototype réalisé fonctionne presque continûment depuis plusieurs mois à notre entière satisfaction. Les bandes obtenues présentent, du fait de la constance du courant, une régularité bien plus grande, ce qui permet, toutes choses égales d'ailleurs, de prédéterminer la durée de l'opération pour obtenir un étalement correct des spots. Comme il est pratiquement impossible de réaliser une imprégnation régulière des bandes par le liquide tampon, il existe à la mise en route une période, durant environ une heure, pendant laquelle s'établit l'humidification qui persistera pendant toute l'opération. Ceci se traduit par une variation de la résistance apparente de l'appareil, donc du courant qui le traverse si on l'alimente à tension constante (ainsi sur un appareil du commerce à tension stabilisée que nous avons essayé, l'intensité passait de 0,5 mA/cm à 1,2 mA/cm entre le début et la fin de l'essai). Cette remarque, ajoutée aux raisons déjà données, montre l'intérêt qu'il y a à disposer d'un générateur capable de faire circuler un courant électrique constant dans les bandes.

Notre dispositif régulateur est basé sur la très faible valeur de la réaction d'anode présentée par une pentode du type amplificatrice de tension. Considérons, par exemple, le réseau de caractéristiques de plaque d'un tube 6M7 tracé à tension de grille-écran constante (fig. 1). Son simple examen montre que pour une valeur donnée de la tension continue de polarisation appliquée à la grille de commande, le courant anodique varie extrêmement peu lorsque la tension plaque passe de 100 volts à 300 volts. A titre d'exemple, et en se plaçant dans le cas le plus défavorable correspondant à $V_{G1} = -2$ volts, on voit

que l'intensité passe de 7,0 à 7,4 mA quand la tension plaque passe de 100 à 300 volts ; et si $V_{gl} = -4$ volts, l'intensité passe de 3,50 à 3,57 mA pour les mêmes valeurs extrêmes de la tension plaque.

Ainsi donc, si l'on insère l'appareil à électrophorèse dans le circuit

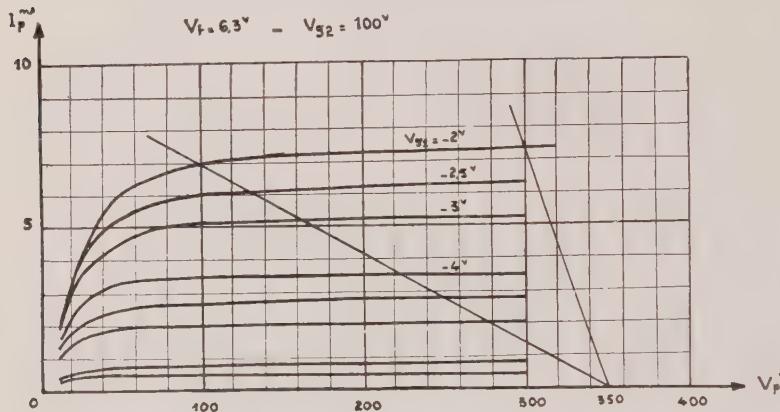


FIG. 1.

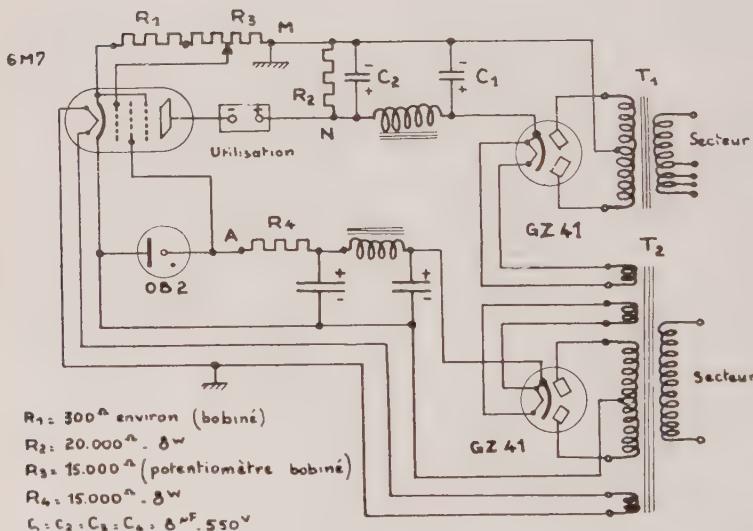


FIG. 2.

anodique d'un tel tube, il sera parcouru par un courant sensiblement constant. Supposons que la tension d'alimentation de l'ensemble soit 350 volts et que la polarisation du tube V_{gl} soit de -4 volts, la tension aux bornes du tube, mesurée entre cathode et plaque, pouvant

varier entre 100 et 300 volts, ceci correspond à une résistance apparente de la cuve à électrophorèse pouvant aller de 250/0,0035 à 50/0,00357 ou encore de 14 000 à 71 000 ohms environ. Pour réaliser pratiquement ce dispositif il faut, d'une part disposer d'une source à tension constante pour l'alimentation de la grille écran du tube, d'autre part pouvoir fixer la tension de polarisation de la grille de commande à la valeur correcte correspondant à l'intensité que l'on veut stabiliser.

La première condition est remplie en faisant appel à un tube au néon du type OB2 qui stabilise une tension de 108 volts à ses bornes tant que l'intensité qui le traverse reste comprise entre 5 et 30 mA : on se met ainsi à l'abri des fluctuations de tension du secteur d'alimentation. Pour la seconde, il suffit d'insérer une résistance dans le circuit de cathode de telle sorte qu'elle soit parcourue par un courant constant, ce qui implique la séparation complète des sources de tension anodique et d'alimentation d'écran. Le schéma complet de notre dispositif est donné ci-contre (fig. 2) avec indication des valeurs des éléments constitutifs; comme valves redresseuses on pourra utiliser des GZ41 ou 6X4, qui sont les plus courantes actuellement. Les prises dont est muni le primaire du transformateur T1 servent à adapter la tension du secteur à celle continue recueillie aux bornes MN du filtre et qui doit être d'environ 350 volts. Pour terminer, indiquons que la résistance R_2 , dont la valeur n'est pas critique, sert simplement à assurer un certain débit à la source anodique et que R_1 fixe la polarisation minimum — 2 volts du tube 6M7 ; on limite ainsi l'intensité maximum que l'on pourra stabiliser à 7 mA environ.

Le montage étant réalisé, la mise au point qui s'effectue une fois pour toutes, se résume à insérer en A un milliampèremètre et régler la valeur de R_1 pour que le courant dans le tube OB2 soit de 17 mA environ ; on se place ainsi au milieu de sa plage de régulation.

Signalons enfin la possibilité d'alimenter 2 appareils à électrophorèse avec le même dispositif d'alimentation. Il suffit alors de les monter en série, quitte à ajuster l'arrivée du secteur sur le primaire de T_1 ; afin d'être complets, ajoutons qu'il y aurait intérêt, théoriquement au moins, à stabiliser le chauffage du tube 6M7 en introduisant en série avec son filament chauffant un tube fer-hydrogène approprié et en alimentant le tout par un transformateur saturé compensé ; en fait ceci n'est pas nécessaire pour l'application que nous avons en vue.

ACTION DES ANTIBIOTIQUES *IN VITRO* SUR LA CROISSANCE DES *CANDIDA*

par U. MARSELOU et G. SEGRETAIN.

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et Physiologie Végétale.)

A la suite de traitements par différents antibiotiques, on a signalé ces dernières années des infections fongiques principalement à *Candida*, se manifestant par des symptômes de perlèche, langue noire, glossite, diarrhée, vomite, irritation rectale ou vaginale.

nale [4, 2, 3]. Ces manifestations sont surtout notées après traitement par l'auréomycine et le chloramphénicol, quand les antibiotiques sont administrés par voie buccale ; l'administration de ces antibiotiques par voie parentérale, et les traitements à la pénicilline donnent rarement des infections fongiques [4].

Diverses explications ont été données sur la fréquence de ces infections fongiques après traitement par les antibiotiques. On a émis en particulier l'hypothèse que les antibiotiques pouvaient agir directement sur la croissance de *C. albicans*. Certains auteurs ont, en effet, trouvé que l'auréomycine stimulait *in vitro* la croissance de *Candida* (évaluation de la croissance par dosage d'azote [5]), ou agissait en augmentant le diamètre des éléments levures au voisinage des cristaux d'antibiotiques [6].

Ces résultats furent infirmés par d'autres auteurs qui ne constatèrent *in vitro* aucune action de l'auréomycine sur *C. albicans* [7, 8]. Lipnic et coll. [9] ont trouvé que le phosphate disodique, contenu dans les capsules servant au conditionnement de l'auréomycine, favorisait la croissance des *Candida* cultivés sur milieu synthétique.

Nous avons recherché dans ce travail l'action des antibiotiques usuels et plus particulièrement de l'auréomycine sur la croissance des *Candida* cultivés sur différents milieux liquides :

1^o Un milieu synthétique sans facteurs de croissance :

Eau distillée Pyrex	1 000 cm ³
Sulfate d'ammonium	5 g
Phosphate monopotassique	1 g
Sulfate de magnésie.	0,5 g
Glucose pur traité par le charbon activé	20 g
Phosphate disodique	0,5 g

2^o Le même milieu enrichi en facteurs de croissance : biotine 1.10⁻¹⁰ et thiamine 1.10⁻⁶.

3^o Milieu de Sabouraud glucosé (20 g par litre) non gélosé.

Ces milieux sont répartis dans de petits Erlenmeyer de 25 cm³, à raison de 5 cm³ de milieu par fiole.

Les antibiotiques suivants sont incorporés aux milieux à différentes doses en conservant dans chaque expérience un témoin sans antibiotique :

Pénicilline G.	doses 10 et 5 unités par cm ³ de milieu.
Streptomycine	— 200 et 50 µg
Chloramphénicol	— 250 et 100 µg
Auréomycine.	— 250 et 100 µg
Terramycine	— 250 et 100 µg

Nous avons expérimenté sur 4 souches de *Candida* :

2 souches de <i>Candida albicans</i>	1. P. 49 et 200
1 souche de <i>C. tropicalis</i>	1. P. 202
1 souche de <i>C. krusei</i>	1. P. 46

Chaque fiole d'Erlenmeyer estensemencée avec 2 gouttes de suspension d'une culture de quarante-huit heures sur gélose Sabouraud.

Dans une première expérience avec la pénicilline nous avons évalué la croissance des *Candida* par différentes méthodes.

Numération des germes au compte-globules à partir d'une même dilution des milieux de culture.

Action de trois antibiotiques sur la croissance de diverses souches de *Candida*.

TEMPÉRATURE	* MILIEU	ANTIBIOTIQUES				TEMOINS	
		250 µg/cm ³		100 µg/cm ³		sans antibiotiques	
		Nombre de cellules au cm ³	Lecture néphélémétrique	Nombre de cellules au cm ³	Lecture néphélémétrique	Nombre de cellules au cm ³	Lecture néphélémétrique
AUREOMYCINE CRISTALLISÉE SUR CANDIDA ALBICANS IP 200							
20°	1	8.10 ⁶	28	8.10 ⁶	28	8.10 ⁶	28
	2	28.10 ⁶	42	29.10 ⁶	42	29.10 ⁶	42
	3	67.10 ⁶	68	67.10 ⁶	68	67.10 ⁶	68
37°	1	7.10 ⁶	27	7.10 ⁶	27	6.10 ⁶	26
	2	25,5.10 ⁶	40	25,5.10 ⁶	40	25,5.10 ⁶	40
	3	65.10 ⁶	67	65.10 ⁶	67	65.10 ⁶	67
TERRAMYCINE SUR CANDIDA ALBICANS IP 49							
20°	1	3.10 ⁶	23	4.10 ⁶	24	5.10 ⁶	25
	2	21.10 ⁶	37	21.10 ⁶	37	23.10 ⁶	38
	3	38.10 ⁶	48	38.10 ⁶	48	39.10 ⁶	49
37°	1	3.10 ⁶	23	3.10 ⁶	23	4.10 ⁶	24
	2	21.10 ⁶	37	21.10 ⁶	37	21.10 ⁶	37
	3	38.10 ⁶	48	38.10 ⁶	48	38.10 ⁶	48
CHLORAMPHENICOL SUR CANDIDA KRUSEI IP 46							
20°	1	6.10 ⁶	26	6.10 ⁶	26	6.10 ⁶	26
	2	18.10 ⁶	36	18.10 ⁶	36	18.10 ⁶	36
	3	52.10 ⁶	58	54.10 ⁶	59	52.10 ⁶	58
37°	1	5.10 ⁶	25	5.10 ⁶	25	6.10 ⁶	26
	2	16.10 ⁶	34	18.10 ⁶	35	18.10 ⁶	36
	3	50.10 ⁶	56	50.10 ⁶	56	50.10 ⁶	56

* 1 : milieu synthétique sans facteurs de croissance; 2 : milieu synthétique enrichi en biotine et thiamine ; 3 : milieu de Sabouraud glucosé, non gélosé.

Mesure néphélémétrique au colorimètre de Meunier.

Poids sec après trois lavages des germes à l'eau distillée.

Numération en boîtes de Petri à partir d'une même dilution des suspensions.

Mesure du diamètre des éléments levures.

Pour un même milieu de culture, ces différentes méthodes ayant

donné des résultats comparables, la croissance des *Candida* dans les expériences suivantes a été mesurée par néphélémétrie et par numération au compte-globules accompagnées d'une mesure du diamètre des levures. Toutes les mesures sont faites après quarante-huit heures de culture à 37° et à la température du laboratoire.

Le résultat de ce travail est qu'aucun de ces antibiotiques n'a d'action sur la croissance des *Candida* ni ne modifie les dimensions de ces levures. Dans les conditions d'expériences *C. albicans* se maintient sous forme levure, tandis que *C. tropicalis* et *C. krusei* filamentent légèrement; les antibiotiques n'ont pas d'action sur cette filamentation.

En revanche, les levures croissent différemment suivant les divers milieux utilisés : croissance très faible en milieu synthétique sans facteurs de croissance ; culture plus riche sur le même milieu additionné de thiamine et biotine, facteurs de croissance pour *Candida* ; enfin croissance nettement plus abondante sur milieu de Sabouraud glucosé non gélosé.

Le tableau résume les résultats obtenus avec l'auréomycine, la terramycine et le chloramphénicol sur des souches différentes de *Candida*.

Nous pouvons donc conclure de ces expériences que les antibiotiques étudiés n'apportent aucun facteur de croissance pour les *Candida*.

Moore, cultivant *C. albicans* sur 250 cm³ de Sabouraud liquide glucosé avec ou sans auréomycine cristallisée (50 mg) avait trouvé, après quarante-huit heures, une augmentation du diamètre des cellules au contact des cristaux d'auréomycine non dissous et une stimulation de la multiplication des levures à distance de ces cristaux. Nous avons repris ces expériences dans les mêmes conditions et nous n'avons pas retrouvé les résultats de cet auteur.

Recherchant une action possible de l'auréomycine sur la cellule de *Candida* nous avons distribué des cristaux de cet antibiotique en quatre points, en boîtes de Petri, à la surface d'un milieu de Sabouraud glucosé gélosé, auquel était incorporé une suspension de *Candida*. L'auréomycine expérimentée provenait de deux sources différentes : auréomycine pure cristallisée et auréomycine du commerce pour traitement *per os*. Après quarante-huit heures à la température du laboratoire nous n'avons trouvé aucune influence sur la filamentation et aucune stimulation de croissance sous l'influence de l'antibiotique.

En résumé les antibiotiques suivants : pénicilline, streptomycine, terramycine, chloramphénicol, auréomycine, sont sans action *in vitro* sur la croissance et la morphologie de *Candida albicans*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. Ces champignons ayant été cultivés en milieu synthétique enrichi en biotine et thiamine, et en milieu de Sabouraud liquide glucosé, les antibiotiques n'ont apporté aucun facteur de croissance pour les germes étudiés.

Mais au cours du traitement par les antibiotiques et en particulier par l'auréomycine, on a souvent signalé chez le malade des infections à *Candida* parfois généralisées et mortelles.

L'action des antibiotiques sur les infections expérimentales à *Candida* chez l'animal a déjà été étudiée par divers auteurs [8, 9, 10, 11, 12] et nous poursuivons nos études sur ce sujet.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. TOMARZEWSKI. *Brit. med. J.*, 1951, **4**, 388.
- [2] S. A. WOLFSON. *Am. J. med. Assoc.*, 1949, **140**, 1206.
- [3] H. J. HARRIS. *J. Am. med. Assoc.*, 1950, **142**, 161.
- [4] W. J. NICKERSON. *Annual Rev. Microbiol.*, 1953, **7**.
- [5] M. HUPPERT, D. A. MACPHERSON et J. CAJIN. *J. Bact.*, 1953, **65**.
- [6] M. MOORE. *J. Lab. Clin. Med.*, 1951, **37**, 703.
- [7] Y. LOPEZ NETTO, R. DE ALMEIDA MOURA et L. P. DE CALVALHO LIMA. *Rev. Instit. Adolfo Lutz*, 1952, **12**, 173.
- [8] A. M. KLIGMAN. *J. Am. med. Assoc.*, 1952, **149**, 978.
- [9] M. J. LIPNIC, A. M. KLIGMAN et R. STRAUSS. *J. Invest. Dermat.*, 1952, **18**, 247.
- [10] G. E. FOLEY et W. D. WINTER. *J. inf. Dis.*, 1949, **85**, 268.
- [11] E. SELIGMANN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **79**, 481.
- [12] R. BROWN, E. L. HAZEN et A. MASON. *Science*, 1953, **117**, 609.

PHYSIOLOGIE DES ACTINOMYCÈTES AÉROBIES PATHOGÈNES

II. — LA PYRIMIDINE, FACTEUR DE CROISSANCE POUR *NOCARDIA LUTEA* ET *NOCARDIA RUBRA*

par F. MARIAT.

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

Dans une première note [1], nous avons mentionné que, de tous les actinomycètes pathogènes essayés, seules les souches de *Nocardia lutea* et *N. rubra* présentaient une exigence vitaminique. Sur milieu synthétique glucosé, ces germes ne se développent en effet qu'en présence de thiamine. Nous donnons ci-dessous un complément d'information au sujet de cette caractéristique.

Matériel et méthodes. — Les cultures sont effectuées dans un milieu liquide contenu dans des fioles d'Erlenmeyer (10 cm³ de milieu dans des fioles de 125 cm³) ; elles sont agitées mécaniquement à 25°. Le milieu de culture de base est le suivant : KH₂PO₄ : 0,54 g ; Na₂H PO₄, 12 H₂O : 3,33 g ; MgSO₄, 7H₂O : 0,60 g ; KCl : 2 g ; hydrolysat de caséine exempt de vitamines : 10 g ; glucose traité par le charbon activé : 10 g ; solution oligodynamique de Berthelot : X gouttes, eau distillée dans le Pyrex : 1 000 cm³ (pH : 7,1).

Chaque fiole contenant le milieu de culture de base additionné des vitamines à étudier estensemencée avec 1 goutte de suspension de l'actinomycète (lavé par centrifugation). La souche de *N. lutea* est la souche de la « London School of Hygiene » isolée d'un cas humain (*Institut Pasteur*, n° 305) ; celle de *N. rubra* est conservée sous le n° 208 par le « Laboratorio crittogramico » de Pavie (*Institut Pasteur*, n° 312). D'autres souches de ces deux espèces de *Nocardia* provenant d'autres

collections ont également été utilisées, toutefois il ne nous a pas été possible de démontrer qu'elles n'avaient pas la même origine que les deux premières.

La croissance est évaluée par néphélémétrie, les valeurs obtenues étant vérifiées dans quelques cas par pesée à température constante. Chaque expérience comprend de 3 à 5 fioles de chacun des milieux particuliers ; elle est répétée au moins trois fois.

Résultats des expériences. — 1^o De toutes les vitamines du groupe B essayées (thiamine, riboflavine, pyridoxine, acide nicotinique, pantothenate de calcium, 0,0005 g/l ; inositol, 0,005 g/l ; biotine, 0,000005 g/l), seule la thiamine est exigée comme facteur de croissance par les deux *Nocardia*. C'est ce qui ressort du tableau ci-dessous (+ + + = bonne croissance, O = aucune croissance).

	<i>N. lutea.</i>	<i>N. rubra.</i>
I. Milieu de base + toutes les vitamines	+++	++
II. Milieu I moins thiamine	0	0
III. Milieu I moins riboflavine.	+++	+++
IV. Milieu I moins pyridoxine.	+++	+++
V. Milieu I moins acide nicotinique.	+++	+++
VI. Milieu I moins pantothenate de calcium.	+++	+++
VII. Milieu I moins inositol	+++	+++
VIII. Milieu I moins biotine	+++	+++
IX. Milieu de base seul	0	0
X. Milieu de base + thiamine seule.	+++	+++

2^o La fraction pyrimidine de la thiamine peut, seule, être substituée à la vitamine B₁ et permettre la croissance des *Nocardia* en expérience. Ces derniers peuvent, à partir de la pyrimidine exogène, synthétiser la molécule entière de thiamine qui leur est nécessaire.

	<i>N. lutea.</i>	<i>N. rubra.</i>
I. Milieu de base	—	—
II. Milieu de base + thiamine ($1 \cdot 10^{-7}$)	+++	+++
III. Milieu de base + pyrimidine ($1 \cdot 10^{-7}$)	+++	+++
IV. Milieu de base + thiazole ($1 \cdot 10^{-7}$)	0	0
V. Milieu de base + pyrimidine + thiazole	+++	+++

3^o La culture de *N. lutea* et de *N. rubra* en présence de concentrations croissantes de pyrimidine (0, 0,875, 1,750, 3,5, 7,0, 14,0, 28,0, 56,0 µg par litre) a permis d'établir les courbes de croissance de la figure 1 (durée de la culture de *N. lutea*, cent quarante-quatre heures, et de *N. rubra*, quatre-vingt-dix-sept heures). La croissance des deux organismes atteint son maximum dès la concentration de 14 µg par litre ($1,4 \cdot 10^{-8}$).

4^o La culture des deux *Nocardia* en présence d'une concentration unique de pyrimidine ($1 \cdot 10^{-7}$) permet d'étudier la croissance en fonction du temps (fig. 2). Les deux courbes sont de même type. Le temps de latence de *N. lutea* est plus long (quatre-vingt-seize heures) que celui de *N. rubra* (cinquante heures). Le taux de croissance du premier est plus faible que celui du second.

Résumé et conclusions. — La pyrimidine de la thiamine est le seul facteur de croissance exigé par *N. lutea* et *N. rubra*. La concentration

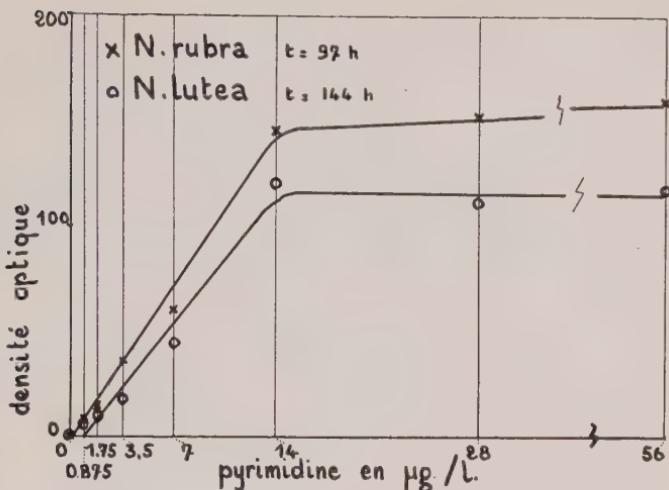


FIG. 1. — Courbes de croissance de *N. lutea* (144 heures) et de *N. rubra* (97 heures), en fonction de concentrations croissantes de pyrimidine de l'aneurine (exprimées en $\mu\text{g/l}$). Les points sont les densités optiques moyennes de cultures diluées au 1/40 et examinées dans le vert.

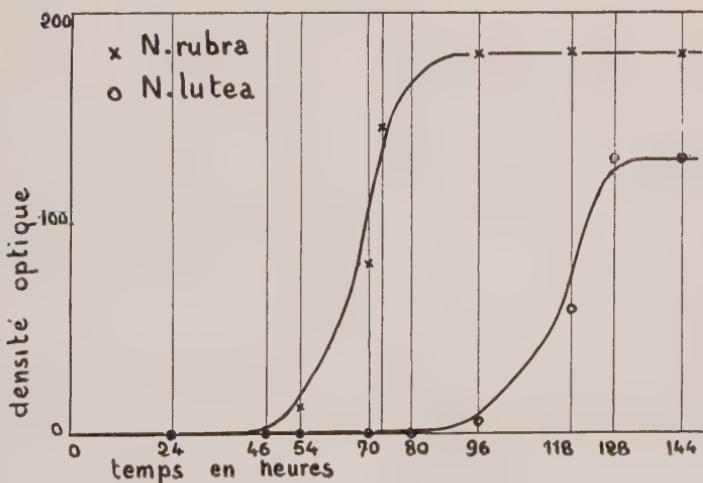


FIG. 2. — Courbes de croissance de *N. lutea* et de *N. rubra* en fonction du temps, en présence de 1.10^{-7} pyrimidine.

optimum étant pour les deux organismes, proche de 10^{-6} . En présence d'une même concentration de pyrimidine (1.10^{-7}), *N. lutea* présente un temps de latence de quatre-vingt-seize heures et atteint sa croissance maximum après environ cent trente heures. *N. rubra*, dont le taux de croissance est plus élevé, ne demande qu'un temps de latence de cinquante heures environ et atteint sa croissance maximum après environ quatre-vingt-dix heures. Les différentes souches étudiées (différentes ?) présentent toutes un même besoin envers la pyrimidine.

Le besoin pour un même facteur de croissance est un caractère supplémentaire qui rapproche l'espèce parasite *N. lutea* (probablement hôte du sol) de l'espèce saprophyte *N. rubra*. Ces deux actinomycètes possèdent de nombreux caractères communs et il semble, comme l'avait déjà remarqué Erikson [2] qu'ils soient extrêmement voisins, sinon identiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. MARIAT. Ces Annales, 1954, **86**, 479.
 [2] D. ERIKSON. Med. Res. Council, Special Report n° 203, 1935.

TRANSMISSION DU VIRUS DE NEWCASTLE AU HÉRISSON

par L. PLACIDI.

(Institut de Biologie Animale. Rabat.)

Nous avons étudié les conditions de la transmission au hérisson (*Aethechinus algirus algirus*) du virus de Newcastle (souche marocaine).

La souche utilisée a été isolée il y a quelques mois au cours d'une grave épizootie. Elle a subi des passages sur l'embryon de poulet et sur la poule. Elle tue celle-ci dans le délai relativement fixe de cinq jours, à la dose de 2 à 3/10 de centimètre cube d'une dilution à 1/10 d'un mélange d'encéphale et de rate broyés.

Quatre hérissons (n°s 7, 8, 9, 10) ont reçu $0,5 \text{ cm}^3$ environ de ce broyat dans l'encéphale et autant dans le péritoine. Ils meurent tous les quatre dans les délais respectifs de quatre jours, quatre-cinq jours, cinq jours et sept jours, après avoir, dès le deuxième jour, manifesté une réaction évidente (immobilité permanente, perte de l'appétit, moindre résistance à l'extension) et la paralysie précédant la mort de vingt-quatre ou quarante-huit heures.

L'autopsie montre la congestion généralisée, parfois intense du poumon, des reins, de la rate. Il ne semble pas que l'intestin soit particulièrement atteint. L'encéphale du n° 7, broyé, dilué en sérum physiologique, et additionné d'antibiotiques dans les conditions habituelles, a été inoculé dans le crâne de deux nouveaux hérissons (n°s 15

et 16). L'un des deux est mort le lendemain ; le deuxième est mort le sixième jour, avec les mêmes manifestations que les précédents. Le cerveau du n° 9, préparé comme celui du n° 7, a été injecté à deux poules (n°s 20 et 21), dans le muscle pectoral. Elles ont succombé toutes les deux avec les lésions courantes de la maladie et dans les mêmes délais que les témoins.

Le hérisson n° 10, mort le septième jour, a été laissé dans sa cage, dans laquelle a été ajouté un nouveau congénère (n° 20) qui a consommé presque entièrement le cadavre du premier. Il a succombé le dix-huitième jour. Son encéphale et sa rate ont été traités comme les organes des précédents et inoculés à un dernier hérisson et à deux poules (n°s 51 et 52). Le premier a succombé le septième jour, les deux poules le quinzième jour, sans présenter de lésions nettes, mais le virus a été mis en évidence dans leurs organes.

Enfin, le broyat des organes du dernier hérisson, mort en sept jours (troisième passage), a été inoculé à deux poules, dont l'une vaccinée contre la maladie de Newcastle a parfaitement résisté, sans manifester le moindre dérangement, tandis que la seconde, non vaccinée, est morte dans le délai de huit jours.

Le résultat de cette expérience est donc parfaitement clair. Le hérisson est réceptif à la maladie de Newcastle ; il peut être infecté par la voie encéphalique, mais aussi par la voie digestive. Dans le premier cas, il succombe régulièrement dans le délai de quatre à sept jours ; dans le deuxième cas, l'évolution paraît sensiblement plus longue.

Il est permis en outre de supposer, d'après ces premières expériences, que le pouvoir pathogène pour la poule s'atténue quelque peu dans l'organisme du hérisson.

L'utilisation de cet animal ne paraît pas présenter d'intérêt particulier pour l'expérimentation sur le virus de Newcastle ; on peut cependant admettre son rôle comme réservoir et propagateur du virus dans les conditions naturelles, ce mammifère étant commun dans nos pays.

Rappelons enfin, pour terminer cette note, que, dans une expérience du même ordre, G. M. Findlay et R. D. Mackenzie [4] avaient transmis en 1937 le virus de la peste aviaire au hérisson, par la voie intracranienne également.

BIBLIOGRAPHIE

[4] G. M. FINDLAY et R. D. MACKENZIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1937, **28**, 258.

Les communications suivantes paraîtront en Mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

L'isolement du bacille de Koch dans les crachats par les détergents, par F. TISON et A. LOZE.

Les propriétés biochimiques caractéristiques du genre *Proteus*. Inclusion souhaitable des *Providencia* dans celui-ci, par R. BUTTIAUX, R. OSTEUX, R. FRESNOY et J. MORIAMEZ.

Diffusion de différentes toxines dans des sérum anti-gangréneux gélosés, par M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY.

La microflore dénitrifiante ; sa présence normale dans le sol,
par H. DE BARJAC.

Effet exercé *in vitro* par le salicylate de sodium sur deux types de réactions antigène-anticorps : l'agglutination bactérienne et l'hémagglutination passive, par J. LEBRUN et A. DELAUNAY.

Nutrition azotée et sporulation de *B. cereus* et *B. mycoides*,
par N. GRELET.

Isolement d'un *Chromobacterium violaceum* à partir de lésions hépatiques observées chez un singe *Cercopithecus cephush*. Etude et pouvoir pathogène, par G. AUDEBAUD, M. GANZIN, J. CECCALDI et P. MERVEILLE.

L'effet des antibiotiques sur les souches entomophytes ou non de *B. cereus*, par C. TOUMANOFF et M^{le} LAPIED.

ÉLECTIONS

MM. Béerens, Goldberg, Minck, Panijel, Paraf et Tacquet sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

LIVRES REÇUS

Actualités pharmacologiques publiées sous la direction de René Hazard.
Sixième série. 1 vol., 224 p., 60 fig., Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1954.
Prix : 1 480 fr.

Ces *Actualités* présentent chaque année, depuis 1949, des revues d'ensemble sur des sujets de pharmacodynamie d'intérêt actuel. Ces sortes d'inventaires des connaissances présentes ne sont pas destinés seulement aux pharmacologues. Ils sont susceptibles aussi d'intéresser tous ceux qu'anime la curiosité de connaître le mode d'action des médicaments.

Huit conférences ont été faites et publiées au cours de l'année 1953 : U. C. Bijlsma (Utrecht) : Les antifibrillants cardiaques. D. Bovet et F. Bovet-Nitti : Rapports de structure entre sympathomimétiques et sympatholytiques ; de l'adrénaline à l'ergotamine. L. Bugnard : Les utilisations des isotopes comme indicateurs ; applications à la pharmacologie. R. Charonnat : Analyse physico-chimique de l'action des anesthésiques locaux. A. Lespagnol : La molécule active, thème d'inspiration de la synthèse médicamenteuse. J. Malmejac : Pharmacodynamie du ganglion

sympathique ; étude sur le plexus solaire irrigué *in situ*. J. Roche et R. Michel : Hormone thyroïdienne et iodoprotéines naturelles et artificiellement iodées. E. Rothin : Structure fonctionnelle du système neuro-végétatif et points d'attaque des alcaloïdes de l'ergot de seigle.

Une table alphabétique donne la liste de toutes les conférences faites dans les volumes précédents des *Actualités*.

H. T.

G. Legrand. *Manuel du préparateur en pharmacie*. 1 vol., 616 p., 73 fig., Masson et Cie, édit., Paris, 1954. Prix : 2 500 fr.

Ce manuel est destiné aux élèves préparateurs en pharmacie. Ceux-ci y trouveront l'intégralité de leurs programmes d'étude et le maximum de renseignements généraux et d'ordre pratique. L'élève-préparateur se trouve donc disposer, avec cet ouvrage, du « manuel d'étude » qui lui manquait. Suffisamment complet, de compréhension aisée, il ne se bornera pas à lui faciliter ses études, mais restera son guide professionnel. Les étudiants en pharmacie des premières années bénéficieront là d'un utile résumé qui pourra leur servir de livre de stage de première année. Les pharmaciens enfin y trouveront un guide de choix pour l'enseignement de leurs élèves.

L'ouvrage est divisé en quatre parties : I. Généralités. II. Notions générales de pharmacie. III. Etude des préparations et formes pharmaceutiques. IV et V. Programme de notions élémentaires.

H. T.

La grippe : état actuel des recherches. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Monographies, n° 20, 1954, 244 p. Prix : Fr. fr., 800 ; Fr. s., 10 ; 17 sh 6 d ; \$, 2,50. Dépositaire, Masson et Cie, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.

La grippe est un problème mondial de santé publique. Quelques spécialistes de six pays ont été invités à passer en revue divers aspects de ce problème complexe. Chacun d'eux a traité un sujet qui lui était particulièrement familier, touchant à l'épidémiologie, à la virologie, à la prophylaxie et à la lutte contre la grippe.

Ces articles ne sont pas seulement d'un haut intérêt scientifique. ils ont une valeur pratique considérable. L'étude de C. H. Andrewes sur l'épidémiologie de la grippe et celle de T. Francis Jr. sur les vaccins antigrippaux faciliteront aux autorités de santé publique la compréhension des problèmes que pose l'utilisation des vaccins. Les cliniciens apprécieront le travail sur la cause et le traitement de la pneumonie grippale, dû à J. Mulder et à C. H. Stuart-Harris. L'étude de F. M. Burnet sur les facteurs somatiques et génétiques du virus grippal et celle de P. von Magnus sur la morphologie du virus, la cinétique de sa multiplication et l'immunologie stimuleront les recherches fondamentales, nécessaires à tout progrès scientifique. Les techniciens de laboratoire, pour leur part, trouveront de nombreuses informations utiles dans l'article de P. Lépine. Les épidémiologistes tirront avec profit l'étude de M. R. Hilleman et coll. sur les anticorps contre le virus grippal dans la population des Etats-Unis et celle de Deutschmann, consacrée aux questions statistiques.

Cette publication contient en outre une bibliographie de travaux récents, complétée par des listes de références accompagnant chaque article.

H. T.

H. D. Kay, J. R. Cuttel, H. S. Hall, A. T. R. Mattick et A. Rowlands.

— *La pasteurisation du lait, organisations, installations, exploitation et contrôle. Organisation Mondiale de la Santé : Série des Monographies, n° 14, 222 p., 93 fig., 3 tabl. ; Prix : Fr. fr., 800 ; Fr. s., 10 ; 12 sh 6 d, \$ 2,50. Dépositaire Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.*

L'ouvrage est une synthèse des renseignements les plus récents sur les divers stades de cette opération, depuis l'organisation d'une usine moderne de pasteurisation jusqu'à l'élaboration de la législation relative à la manipulation et au traitement du lait. La condition essentielle, en matière de pasteurisation, est de disposer d'une laiterie bien conçue et bien équipée. La monographie fournit un exposé complet des problèmes que pose la question. Elle décrit aussi les trois techniques de pasteurisation les plus communément pratiquées et le type d'installations correspondant à chacune d'elles.

Un contrôle au laboratoire est indispensable, à toutes les étapes de la pasteurisation. On indique les diverses épreuves pratiquées et les appareils nécessaires.

H. T.

A. H. Bennett, H. Jupnik, H. Osterberg et O. W. Richards. — *Phase Microscopy. Principles and Applications.* 1 vol., 320 p., J. Wiley and Sons édit., New-York, 1951. Prix : 7 dollars 50.

Les auteurs de ce livre ont été des premiers à se livrer aux recherches sur la microscopie en contraste de phase et leurs travaux ont grandement contribué aux résultats auxquels on est maintenant parvenu. Leur livre est une mise au point de l'état actuel de nos connaissances sur le microscope en contraste de phase et sur ses applications pratiques à de nombreux problèmes. Il est divisé en plusieurs parties qui, après une Introduction historique et générale, étudient la théorie de la microscopie en contraste de phase, les instruments qu'elle implique, sa technique et ses applications en biologie, en médecine et dans l'industrie. Le volume est abondamment illustré de figures et de planches hors texte.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.